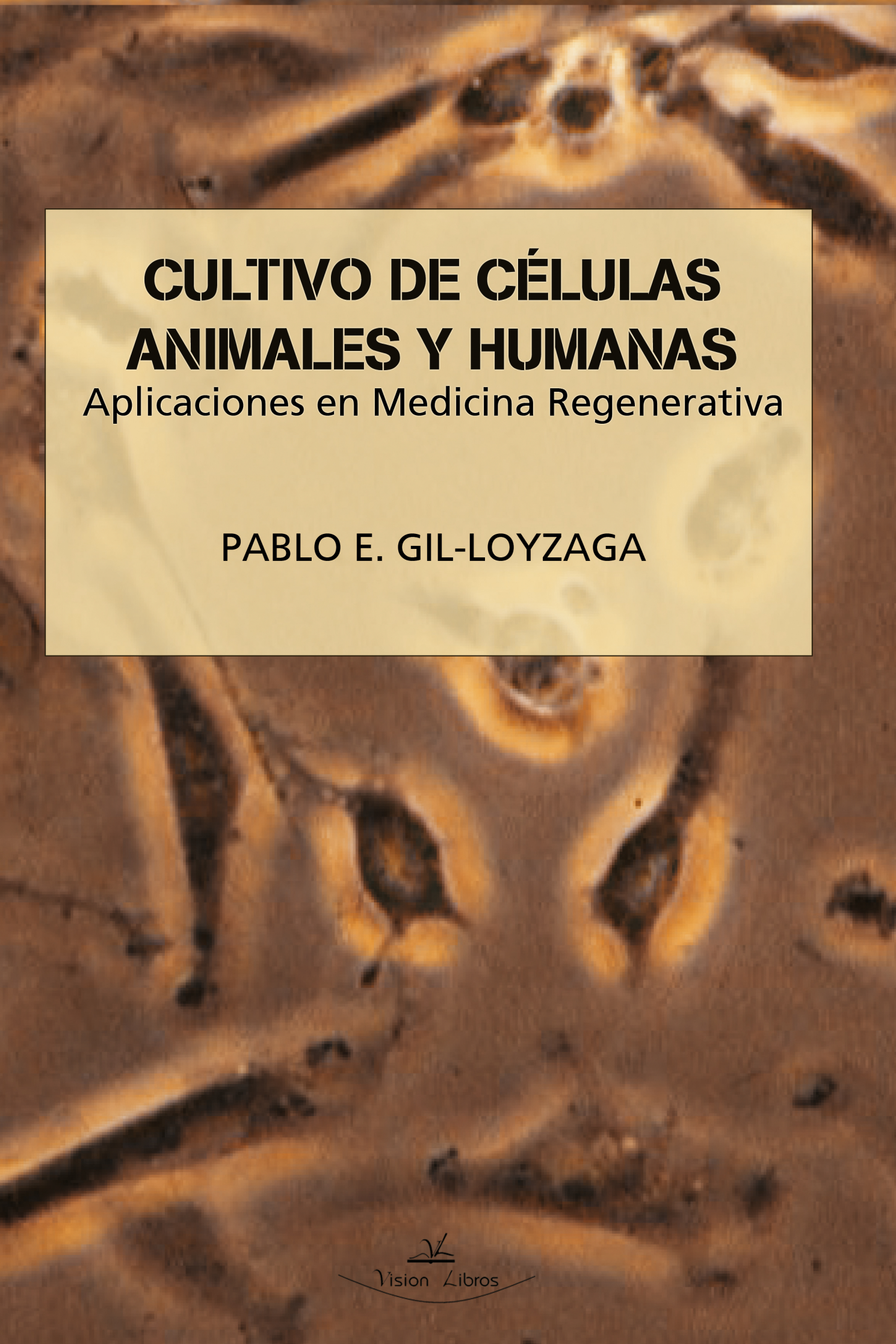


CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES Y HUMANAS

Aplicaciones en Medicina Regenerativa

PABLO E. GIL-LOYZAGA

Vision Libros

CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES Y HUMANAS

Aplicaciones en Medicina Regenerativa

Pablo E. Gil-Loyzaga

Catedrático de Neurobiología de la Audición

Director Dpto. Oftalmología y Otorrinolaringología. Facultad de Medicina.

Director de la Cátedra Extraordinaria de Innovación y Salud F.G.-U.C.M.

Ex Director del Centro de Cultivos Celulares (C.A.I.-U.C.M.)

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Madrid, 2011

Vision Libros

CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES Y HUMANAS. APLICACIONES EN MEDICINA REGENERATIVA
© Prof. P. Gil-Loyzaga. Cátedra innovación y Salud. Fundación FG-UCM.
© Editorial Vision Libros
Calle San Benito, 21, Local
Tel: 0034 91 3117696 url: www.visionlibros.com
Vision Libros es marca registrada de Vision Netware S.L.

ISBN: 978-84-9983-738-3

Descargado de: www.visionlibros.com

Diseño de la cubierta: Marian González
reflejandoelazul@visionnet.es

Distribuye y produce:
Distribuidora de publicaciones. C/ Magnolias, 35 Bis, Local.
28029 Madrid.

Pedidos a: pedidos@visionnet.es
www.distribuciondigital.com

Reservados todos los derechos. Esta publicación no puede ser reproducida ni registrada sin el permiso previo por escrito de los titulares del copyright.

Las opiniones expresadas en este libro y textos son de exclusiva responsabilidad de cada autor.

Prólogo

Constituye para mí un gran honor prologar este libro por encargo de mi apreciado amigo Pablo Gil-Loyzaga, con quien me une una gran amistad y a quien admiro por su categoría humana y por ser un modelo de entusiasmo, honestidad y capacidad como docente, investigador y profesor universitario. Mi primera impresión al leer la obra fue necesariamente muy positiva por tratar de forma muy detallada y actual uno de los temas más dinámicos de las ciencias biomédicas en el momento presente. Se trata de un manual colectivo que reúne a los mejores expertos en el campo de los cultivos celulares orientado hacia la medicina regenerativa.

Los cultivos celulares han constituido una fuente de conocimiento extraordinaria en un amplio abanico de especialidades de las ciencias básicas y aplicadas a la salud. Se trata de un conjunto de técnicas que está contribuyendo de forma decisiva al avance de las ciencias biomédicas por sus aplicaciones diagnosticas e incluso terapéuticas y que permite encarar nuevas líneas de investigación orientada hacia la industria farmacéutica, la agricultura, la toxicología, etc.

El conocimiento científico en relación con el potencial aplicado de los cultivos celulares no ha hecho más que aumentar desde principios del siglo XX, con los trabajos pioneros de cultivo de tejidos de Ross G. Harrison (1870-1956) y Alexis Carrel (1873-1944), pasando por los cultivos de células disociadas de la década de los cuarenta hasta que, ya en la década de los sesenta, se reconoció que ciertas células de ratón tienen la capacidad de crear varios tipos de tejidos, lo qué culminó con el descubrimiento de las «células madre» en los ratones en 1971. Desde un principio, los científicos aprendieron a aislar y manejar las células lo suficientemente bien como para cultivarlas *ex vivo* y mantenerlas en proliferación por tiempo ilimitado. Tal vez no está lejos la idea de organizar estructuras *in vitro* e incluso reagruparlas para reconstruir órganos.

La eficacia tecnológica en el campo de los cultivos celulares y de tejidos animales y humanos incluye también a las procedentes de embriones, que empezaron a atraer la atención de muchos investigadores a finales de los años noventa. Sin embargo, en lo que concierne a este tipo de células, esta tecnología ha planteado un grave problema ético, dado que no se pueden aislar del embrión si no es manipulándolo tras crearlo en el laboratorio, en un proceso que implica la muerte del embrión mismo. Además del problema ético, las células procedentes de embriones conllevan otros en la vertiente aplicada, por la posibilidad de formación de tumores, rechazo inmunológico y capacidad de desarrollo.

Desde principios de la década de los noventa se había venido publicando, en revistas tan prestigiosas como los *Proceedings of the National Academy of Sciences, Nature, Science, Cell*, etc., las primeras experiencias demostrativas de que en tejidos somáticos post-embrionarios, fetales y de adulto, hay células madre con una gran capacidad de desdi-

ferenciación y reprogramación hacia el mismo o diferente tipo de tejido celular, resultando pluripotentes en lo que a la capacidad de diferenciación se refiere.

En los últimos años y en paralelo con estos grandes avances se ha producido otro gran descubrimiento, el conocimiento de la información genética completa del genoma humano, al que se ha añadido el de otras especies que habitualmente se utilizan en la experimentación clínica. El Proyecto Genoma Humano se dio por concluido, al menos en su aproximación estructural, en abril de 2003, justamente al cumplirse los 50 años del descubrimiento de la estructura de la «molécula de la vida», el ADN.

El cultivo de las células animales y humanas y el conocimiento del genoma humano, y en particular de numerosos genes que intervienen en los procesos de desarrollo y diferenciación celular, han abierto la posibilidad de manejar las células y utilizarlas en nuevos experimentos en el laboratorio. De este modo se puede estudiar su comportamiento en cultivo en presencia de determinadas sustancias metabólicas, inducir su diferenciación hacia otras especialidades, modificarlas genéticamente, observar el efecto de nuevos fármacos, reprogramar la expresión de sus genes, hacer diagnóstico genético, etc. Todo esto ha dado lugar a numerosas patentes, cientos de ensayos clínicos y un torrente de publicaciones científicas sobre todo tipo de experimentos que demuestran qué y cómo unas células de un tipo de tejido pueden crecer e incluso transformarse en células de otro tejido y adquirir propiedades funcionales distintas a las originales.

Esta auténtica «alquimia celular» está dando paso al cultivo de tejidos y sobre todo a su trasplante con fines terapéuticos, un campo cuyas posibilidades eran hasta hace poco tiempo insospechadas. Señala el Profesor Gil-Loyzaga, a propósito de los grandes avances de las ciencias biomédicas de las últimas décadas, que la terapia celular está llamada a convertirse en la mejor aliada del tratamiento del cáncer y de las enfermedades degenerativas, -especialmente las neurodegenerativas-, la regeneración cardiaca post-infarto, las enfermedades del sistema endocrino, los grandes traumatismos, etc. Sin olvidar su evidente aplicación para paliar el envejecimiento natural, mejorando la calidad vital de los individuos mayores. El fin último de los estudios con células madre o troncales es el de reemplazar las células anómalas, lesionadas, muertas o degeneradas por otras sanas, consiguiendo algo tan importante como es la recuperación de las funciones perdidas. Al leer esta clarísima explicación, tan llena de esperanza para tantas y tantas personas que padecen y hacen padecer a quienes les rodean, no puede uno más que llenarse de ilusión por una especialidad tan apasionante como la terapia reparadora de tejidos.

En la medicina reparadora confluyen dos aproximaciones que han marcado el avance del conocimiento científico en este campo en los últimos tiempos y que constituyen las dos partes del presente manual: la vertiente metodológica y las aplicaciones. Es sobre esto sobre lo que versa este libro, que se convierte en una obra necesaria para quienes deseen profundizar en uno de los campos más fascinantes y prometedor de la medicina de principios del siglo XXI.

Las dos primeras partes del libro se dedican a las técnicas y medios necesarios para el cultivo de muy diversas especialidades celulares animales y humanas: tejido conjuntivo, condrocitos, osteocitos, células musculares esqueléticas, de la cresta neural, epidérmicas,

epiteliales del tracto gastrointestinal, hepatocitos, células neurales, tumorales, etc. Todo un conjunto de técnicas y protocolos explicados de forma muy detallada por un gran plantel de especialistas y que constituyen una excelente guía para quienes deseen profundizar en el conocimiento del análisis morfológico, citotoxicidad, viabilidad, etc., y conocer las dificultades que plantean los cultivos celulares.

La tercera parte del libro se dedica a la vertiente aplicada y nos ofrece una visión completa, actual y potencial del cultivo de las células madre y de sus esperanzadoras aplicaciones clínicas. Se incluyen en este bloque los principales temas de aplicación en la medicina regenerativa, fruto del desarrollo de protocolos y ensayos clínicos, producción de bancos de células, mantenimiento de líneas celulares, síntesis y ensayos de nuevos fármacos y tratamientos, etc. Los varios expertos en los diferentes temas, nos explican los datos sobre los fenómenos causantes de las patologías que afectan a las células y tejidos en sus propiedades fisiológicas, genéticas, bioquímicas, moleculares, inmunológicas, etc. Además nos explican cómo el manantial de conocimientos que van surgiendo está abriendo una gran esperanza de recuperación de la salud y mejora del nivel de vida de muchos pacientes. Hoy ya están en uso un limitado grupo de terapias celulares dirigidas a la solución de un conjunto importante de patologías que afectan a órganos tan vitales como el corazón, el oído, los ojos, la epidermis, etc., cuyo abordaje no deja de ser una necesidad y una de las más nobles y genuinas tareas que ha de afrontar la medicina actual. Las detalladas descripciones de la experimentación con cultivos celulares recogidas en este manual ponen de manifiesto las inmensas posibilidades que ofrecen.

El campo de la medicina regenerativa ha sufrido en los últimos años un envite utilitarista que afortunadamente parece superado por los resultados de la propia experimentación. Los cultivos de células somáticas parecen haber desplazado a las células madre embrionarias que en su perspectiva inicial se ofrecían como una vía adecuada para afrontar la medicina regenerativa. A este respecto el Dr. Angelo Vescovi, investigador del Banco de células cerebrales (Milán) y pionero de las investigaciones con células madre no embrionarias con fines terapéuticos, señala: «a lo largo de los años, se han propuesto numerosas tesis y argumentaciones con el objetivo de saltarse el problema ético, pero no han tenido éxito. Desde la trivialización de la naturaleza del embrión, reducido de modo subrepticio a un «grumo de células» —prescindiendo de las evidencias científicas que apoyan el hecho de que constituye una de las distintas fases de la vida humana que se desarrollan en un continuum sin interrupciones— hasta el hecho de que no habría vías alternativas para el uso de las células madre embrionarias… Hoy podemos afirmar que el uso de embriones humanos no es, en absoluto, una necesidad inevitable».

Para finalizar deseo señalar lo que me parece más importante de este libro. El rigor científico y la claridad con que se abordan todos los capítulos. Es una manifestación de la meticulosidad e integridad intelectual del autor y coordinador de la obra, Pablo Gil-Loyzaga, siempre comprometido con la verdad científica y la dignidad de la vida humana.

Alcalá de Henares, 9 de Mayo de 2011.

Prof. Nicolás Jouve de la Barreda
Catedrático de Genética, Universidad de Alcalá

Autores

María Visitación Bartolomé Pascual
Profesora Contratada Doctora. Departamento Oftalmología y Otorrinolaringología. Facultad de Psicología. Universidad Complutense de Madrid.

Natalia Laura Battiato
Responsable del Laboratorio de Cultivo Celular. Centro de Biología Celular y Molecular (CEBICEM, FCEFN). Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Francisco Carricondo Orejana
Profesor Ayudante Doctor. Departamento Oftalmología y Otorrinolaringología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

Marta Domínguez Muñoa
Médico Adjunto. Servicio de Cardiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

José Echeveste Ucar
Médico Especialista. Departamento Anatomía Patológica. Clínica Universitaria. Navarra. Pamplona.

María Eugenia Fernández Santos
Directora de la Unidad de Producción Celular. Servicio de Cardiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Francisco Fernández-Avilés
Catedrático y Jefe de Servicio de Cardiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Ana Fernández Hortelano
Facultativo Especialista de Área (FEA). Unidad de Polo Anterior. Hospital Universitario de Getafe.

María García Guzmán
Área de Terapia Celular y Hematología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

Damián García-Olmo
Catedrático Jefe de Servicio de Cirugía. Director de la Unidad de Terapia Celular. Hospital Universitario La Paz. Madrid.

Pablo E. Gil-Loyzaga
Catedrático de Neurobiología de la Audición. Director Dpto. Oftalmología y Otorrinolaringología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

Jesús Herreros González
Profesor Titular de Cirugía. Director del Servicio de Cirugía Cardiovascular. Clínica Universitaria. Universidad de Navarra.

Maria Dolores Herreros Marcos
Médico. Servicio de Cirugía. Investigador de la Unidad de Terapia Celular. Hospital Universitario La Paz. Madrid.

María Cruz Iglesias Moreno
Médico Adjunto. Servicio Otorrinolaringología. Hospital Clínico San Carlos.
Profesora Asociada. Dpto. Oftalmología y O.R.L. Fac. Medicina. Universidad Complutense Madrid.

Ingrid Ludwig Martín
Enfermera Investigación. Servicio Cardiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Javier Moreno Montañés
Director. Departamento de Oftalmología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

María Gabriela Paglini
Investigadora Adjunta - Instituto Ferreyra INIMEC - CONICET y Profesora Adjunta - Instituto de Virología. FCM. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Isabel Pascual Migueláñez
Médico. Servicio de Cirugía. Investigador de la Unidad de Terapia Celular.
Hospital Universitario La Paz. Madrid.

Joaquín Poch-Broto
Catedrático de Otorrinolaringología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Director Médico Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Felipe Prosper Cardoso
Área de Terapia Celular y Hematología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

Laura Rico Sánchez
Gerente de Investigación. Cellerix S.L. España.

Fernando Rodríguez Gómez
Profesor Titular Esc. Dpto. Oftalmología y Otorrinolaringología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

Roberto A. Rovasio
Investigador Principal (CONICET, Argentina). Profesor Plenario de Biología Celular y Director del Centro de Biología Celular y Molecular (CEBICEM, FCEFN). Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Pedro L. Sánchez Fernández
Médico Adjunto. Servicio de Cardiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Ricardo Sanz Ruiz
Médico Adjunto. Servicio de Cardiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Jacobo Trébol López
Médico. Servicio de Cirugía. Investigador de la Unidad de Terapia Celular. Hospital Universitario La Paz. Madrid.

Elena Vara Ameigeiras
Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular. Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular III. Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

María Ángeles Vicente-Torres
Profesora Contratada Doctora. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

José Antonio Zueco Alegre
Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular. Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular III. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

Índice

PRIMERA PARTE: CONCEPTOS Y TÉCNICAS PARA CULTIVOS CELULARES

Capítulo 1. *P. E. Gil-Loyzaga.* Cultivo de células animales y humanas: conceptos y aplicaciones. Historia de los cultivos celulares 17
Capítulo 2. *F. Carricondo, P. E. Gil-Loyzaga.* Estructura general de un laboratorio de cultivos celulares. Equipamiento esencial para las técnicas de cultivos celulares 35
Capítulo 3. *M. A. Vicente-Torres.* Condiciones de incubación de tejidos y células en estufa de CO_2 53
Capítulo 4. *M. A. Vicente-Torres.* Obtención de tejidos y células para desarrollo in vitro 65
Capítulo 5. *P. E. Gil-Loyzaga.* Las células eucariontes en cultivo in vitro 73
Capítulo 6. *M. V. Bartolomé.* Métodos morfológicos aplicados al estudio de cultivos de células animales 87
Capítulo 7. *E. Vara y P. E. Gil-Loyzaga.* Criopreservación de células y tejidos .. 103
Capítulo 8. *P. E. Gil-Loyzaga.* Cultivos celulares tridimensionales 113
Capítulo 9. *P. E. Gil-Loyzaga.* Contaminaciones en los cultivos de células animales 121

SEGUNDA PARTE: CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES Y HUMANAS

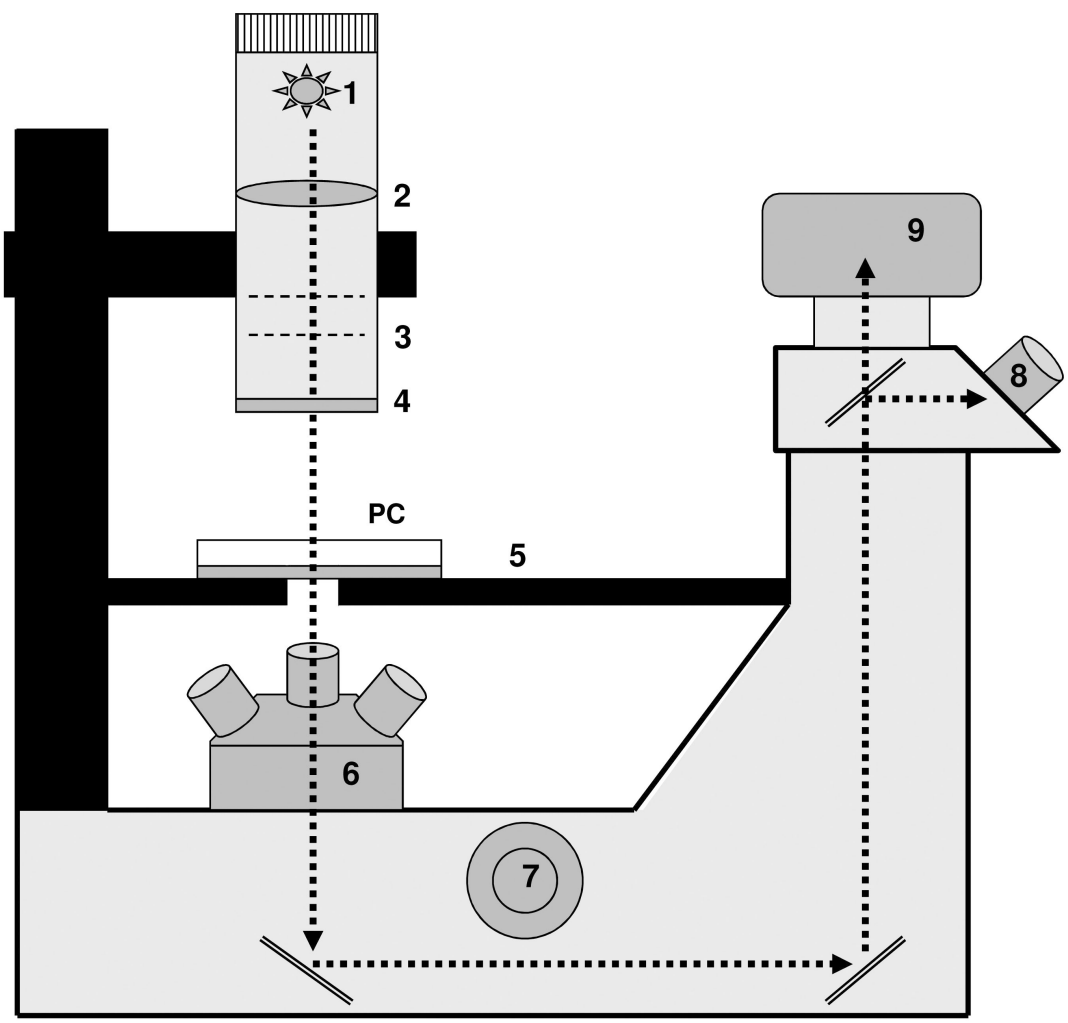
Capítulo 10. *M. V. Bartolomé.* Cultivo de células conjuntivas 145
Capítulo 11. *F. Carricondo.* Cultivo de condrocitos. Cultivo de osteocitos..... 157
Capítulo 12. *F. Carricondo, P. E. Gil-Loyzaga.* Cultivo de células musculares esqueléticas. Cultivo de miocitos lisos y cardiacos 167
Capítulo 13. *M. V. Bartolomé.* Células epiteliales: requerimientos y características generales. Cultivo de células epidérmicas 175
Capítulo 14. *M. V. Bartolomé.* Cultivo de células epiteliales: tracto gastrointestinal, células renales, de epitelios traqueal y bronquial. Cultivo de células endoteliales 183
Capítulo 15. *E. Vara.* Cultivo de células glandulares pancreáticas 195
Capítulo 16. *J. A. Zueco.* Cultivo de hepatocitos..... 203
Capítulo 17. *M. G. Paglini.* Cultivo de células neurales 211
Capítulo 18. *R. A. Rovasio, N. L. Battiato*. Células de la cresta neural: Cultivo y métodos para estudiar la migración celular 227
Capítulo 19. *F. Carricondo.* Cultivo de células de vertebrados no mamíferos e invertebrados 245
Capítulo 20. *P. E. Gil-Loyzaga*. Cultivo de células tumorales 253

Capítulo 21. *M. V. Bartolomé.* Líneas celulares. Células híbridas..... 273
Capítulo 22. *P. E. Gil-Loyzaga.* Citotoxicidad in vitro..... 287

TERCERA PARTE: APLICACIONES EN MEDICINA REGENERATIVA
Capítulo 23. *P. E. Gil-Loyzaga.* Células madre y su cultivo. Aplicaciones en Medicina Regenerativa..... 297
Capítulo 24. *E. Vara.* Transplante de células pancreáticas 315
Capítulo 25. *J. Trébol López, I. Pascual Migueláñez, M. D. Herreros Marcos, D. García-Olmo.* Células madre y cicatrización..... 329
Capítulo 26. *J. Herreros.* Regeneración cardiaca con células madre: Aplicaciones clínicas 343
Capítulo 27. *R. Sanz-Ruiz, M. Domínguez Muñoa, I. Ludwig Martín, M. E. Fernández, P. L. Sánchez Fernández, F. Fernández-Avilés.* Terapia celular de reparación miocárdica en pacientes que han sufrido un infarto agudo de miocardio..... 357
Capítulo 28. *A. Fernández Hortelano, J. Moreno Montañés, F. Prosper Cardoso, M. García Guzmán, J. Echeveste.* Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas..... 369
Capítulo 29. *L. Rico.* Terapia celular cutánea. Aplicaciones en epidermolisis bullosa 381
Capítulo 30. *F. Carricondo, M. C. Iglesias, F. Rodríguez, J. Poch-Broto, P. E. Gil-Loyzaga.* Células madre de receptor auditivo: técnicas de cultivo y aplicaciones 391

PRIMERA PARTE

CONCEPTOS Y TÉCNICAS PARA CULTIVOS CELULARES



CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES Y HUMANAS.
APLICACIONES EN MEDICINA REGENERATIVA
Editorial Vision Libros. Madrid (2011)
ISBN: 978-84-9983-737-6

CAPÍTULO 1

Cultivo de células animales y humanas: conceptos y aplicaciones. Historia de los cultivos celulares

Pablo E. Gil-Loyzaga

Departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología.
Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid

CONCEPTO DE CULTIVOS DE TEJIDOS Y CÉLULAS ANIMALES

Se define el cultivo de células y tejidos animales como la técnica mediante la cual es posible mantener fragmentos de tejidos u órganos, o incluso células, en situación de aislamiento de un organismo pluricelular. Pero para que la técnica pueda ser considerada como válida y útil, para experimentación u otras aplicaciones, es necesario que dichos tejidos o células realicen al menos una parte de las funciones que tenían en el organismo completo.

Las posibilidades que aportan las técnicas de Cultivos de Células y Tejidos se deben a las diferencias entre la situación de las células eucariontes en el seno de un pluricelular y aisladas en un cultivo in vitro (ver comentarios en Adolphe 1988, Freshney 1990, 2005). Entre las más destacables se deben tener en cuenta las siguientes peculiaridades:

1. En el cultivo in vitro las células aisladas, o en un tejido en cultivo tridimensional, pierden la relación con el resto de los sistemas orgánicos del animal del que proceden. Ya no reciben estímulos regulatorios de los sistemas endocrino ni nervioso, por lo que no tienen control homeostático. etc. Además ya no se encuentran bajo la protección del sistema inmunitario, por lo que las posibilidades de colonización por microorganismos serán muy altas (Capítulo 9).
2. En el cultivo de células disociadas no se conserva la estructura tridimensional de los tejidos. Las células pierden su relación con las vecinas (que pueden ser del mismo tipo de tejido u otro) y esta situación desbloquea la inhibición por contacto lo que favorece la proliferación. Además se pierden la interacción con las células vecinas. También por ello se favorece la motilidad celular, inhibida en el tejido original.
3. En el cultivo de células disociadas la propagación celular se realiza, generalmente, en dos dimensiones. Salvo que se explanten las células en una malla tridimensional o estructura similar.
4. Inicio o incremento de proliferación y de la movilidad celular.
5. Se producen numerosos cambios celulares de tipo adaptativo (ver Capítulo 5), con especial efecto sobre el metabolismo celular (mayor utilización de glucólisis, etc.), que hacen que la fisiología de las células in vitro pueda no ser representativa de la que tienen en el animal vivo.

Aunque se trata de una técnica relativamente sofisticada, y que requiere un equipo (ver Capítulo 2) y mantenimiento (ver Capítulo 9) adecuados, lo cierto es que se ha venido implantando en la mayoría de los laboratorios de Ciencias Biomédicas. Es una técnica muy adecuada para la investigación en ciencias experimentales y de la salud y, también, por sus aplicaciones diagnósticas, industriales e incluso terapéuticas. Como ya afirmaba en 1994 la Profa. Bernice M. Martin, (Suffolk Univ. Boston USA) "El cultivo de células es una técnica muy potente si se realiza y dirige correctamente, pero puede ser una gran pérdida de tiempo y dinero si se lleva a cabo sin orden". A esta frase me gustaría añadir que, hoy en día, puede convertirse en un completo fracaso si no se dispone del entrenamiento técnico adecuado.

Uno de los mayores problemas es que se suele olvidar que las células eucariontes procedentes de animales pluricelulares han seguido un largo proceso de especialización (más de 1.000.000.000 de años) desde los primeros unicelulares hasta ellos. Pero los primeros pluricelulares que entonces se formaron tampoco tenían la complejidad creciente que han ido adquiriendo hasta llegar a los mamíferos (cuyas células son sujeto mayoritario de los estudios de cultivos celulares de eucariontes).

Tal vez una de las funciones que más se ha especializado sea la nutrición, contando en los pluricelulares con células especializadas en absorción (de nutrientes, de O_2), metabolismo de grandes moléculas, distribución mediante red vascular, control y mantenimiento de la homeostasis, etc. La "vuelta a condiciones de aislamiento unicelular", en los pocos minutos que debe durar la disección y disociación celular, hacen que se pierdan esas y otras muchas características (organización tridimensional y pérdida de células especializadas en la defensa tisular, etc.), todo lo cual suele ser suficientemente traumático para que la mayoría de las células eucariontes procedentes de pluricelulares degeneren y se lisen con facilidad. Esto da una primera idea del cuidado especial que requiere un cultivo de este tipo de células (temperatura, O_2, control externo del pH, nutrientes adecuados, etc.). También permite comprender los motivos básicos por los que será más fácil el cultivo de células inmaduras, y el de aquellas que no son muy complejas, que el de células adultas, en especial las muy diferenciadas. Estos conceptos permiten planificar adecuadamente un cultivo y conocer que las células eucariontes en cultivo podrán alcanzar un importante grado de diferenciación pero, al menos con las técnicas actuales, no se puede esperar que puedan realizar todas las funciones que llevan a cabo en el vivo. Por tanto, unas de las misiones esenciales del diseño del cultivo será la de definir cuales son las funciones celulares que más interesan a fin de intentar que las células orienten su diferenciación en ese sentido.

CULTIVOS CELULARES EN LAS CIENCIAS EXPERIMENTALES Y DE LA SALUD [1]

Las técnicas de cultivos celulares comenzaron a desarrollarse a mediados del siglo XIX siendo pronto utilizadas para un mejor conocimiento de la fisiología y el comportamiento celular, tanto de células normales como tumorales. Los científicos que comenzaron a utilizarlas se contentaron al principio con la mera posibilidad de mantener fragmentos

1 Para no hacer demasiado prolija esta parte se citan solo algunos de los trabajos utilizados para escribir este texto aunque el autor reconoce la utilización de otros muchos, especialmente Parker 1967, Albarracín 1983 a y b, Adolphe 1988, Wigley 1994, Freshney 1990, 2005 y otros que se citan en la sección Bibliografía Utilizada y Consultada.

de órganos aislados durante periodos relativamente limitados, pero pronto se plantearon metas cada vez más complejas. Se pasó del estudio de tejidos de poiquilotermos a homeotermos y de disecciones más o menos burdas a la fina individualización celular empleando enzimas hidrolíticas.

A lo largo del siglo XX las posibilidades y aplicaciones de éstas técnicas no han dejado de aumentar, por ello los cultivos celulares han permitido alcanzar metas muy importantes de numerosas disciplinas tanto de Ciencias Básicas (Biología Celular, Fisiología, Bioquímica, Genética, Inmunología, Microbiología-Virología, Ecología, etc.) como de Ciencias de la Salud (Oncología, Farmacología, Toxicología, Terapia Celular, etc.). A partir de los numerosos estudios científicos y experimentales se han desarrollado nuevas posibilidades que han permitido implantar los cultivos celulares como rutina no sólo para proyectos de investigación básica, sino también para el desarrollo de industrias para la síntesis de moléculas (anticuerpos, fármacos, hormonas etc.), o los "bancos de células", etc.

En *Biología Celular,* por ejemplo, las técnicas de cultivo celular han permitido profundizar en el conocimiento de la fisiología de las organelas celulares (membrana, mitocondrias, lisosomas, etc.), el metabolismo, la diapédesis, la replicación de DNA y la mitosis, y otros muchos procesos que han sido ampliamente estudiados in vitro. Se han estudiado la interacción entre las células y los mecanismos de adhesión celular, respuestas a estímulos externos, el envejecimiento celular, etc. El seguimiento de moléculas muy selectivas, marcadas con radioisótopos, que son administradas a cultivos de células y tejidos ha permitido desentrañar las estructuras implicadas en la secreción de estructuras complejas (Gil-Loyzaga y cols. 1991) para el estudio de la absorción de substancias y fármacos y de su metabolismo celular, aunque dichos estudios se complementan y comparan, frecuentemente, con estudios in vivo (Remezal y Gil-Loyzaga 1993). En *Neurobiología* tienen un gran interés las interacciones celulares in vitro, la fisiología neuronal, y la formación de circuitos neuronales y otros muchos aspectos (Gil-Loyzaga y Pujol 1990, Gil-Loyzaga y cols. 1992). En modelos de cultivo de tejidos (Gil-Loyzaga y cols. 1992) y de células aisladas se han analizado numerosos procesos básicos de la embriología y de los efectos de substancias tróficas, la diferenciación celular y los factores de crecimiento. También se han estudiado los efectos del magnetismo y la radiación sobre las células.

Los cultivos han permitido la generación de nuevas líneas de investigación. Un ejemplo, entre otros, puede ser el desarrollo de la Ecotoxicología in vitro abordada tanto por biólogos, veterinarios o ingenieros agrónomos, ha permitido conocer el potencial tóxico de numerosas substancias (plaguicidas y pesticidas) antes de su utilización en la industria o en la agricultura.

En *Farmacología y Toxicología* se emplean ampliamente los modelos basados en la reactividad de las células aisladas, con las conocidas restricciones de extrapolación directa de los hallazgos al animal vivo. Las técnicas de toxicidad se están ampliando progresivamente habiéndose enunciado la DL-50 in vitro como la capacidad de inhibición del 50% de la proliferación celular en un cultivo. El desarrollo de estos modelos ha tenido, además, una gran acogida entre los movimientos de defensa de los animales.

Las *aplicaciones industriales y de biofarmacia* están siendo cada vez más relevantes. Desde el aprendizaje de las técnicas de fusión celular y creación de hibridomas se ha puesto en marcha la síntesis industrial de anticuerpos monoclonales. Pero además, se producen industrialmente hormonas (hormonas de crecimiento, insulina, etc.) linfoquinas, factores tróficos, interferón, etc.

En *Medicina* se han utilizado en el estudio de la etiología y fisiopatología de diversas enfermedades, sobre todo en el diagnóstico precoz de enfermedades genéticas, enfermedades virales, degenerativas y del cáncer. En el campo de la *Microbiología* se emplean cultivos de células como base para la investigación en virología en el análisis y la replicación de retrovirus (Leyva-Cobián 1985), base para la búsqueda de nuevas terapéuticas. En *Inmunología* han sido muy útiles en el estudio de las células inmunocompetentes, de su biología y de las reacciones antígeno-anticuerpo (Regueiro y López-Larrea 1996). En *Oncología* han sido muy útiles en el estudio de los oncogenes, su activación, los efectos de su expresión, etc. En el tratamiento de grandes quemados, por ejemplo, se ha generalizado la utilización de tejidos cutáneos para transplantes.

En el momento actual, la posibilidad de utilización de células madre o troncales (Capítulo 23) en la terapia de numerosas patologías, tumorales o no, supone un importante y nuevo avance de la Medicina que también requiere cultivo de células y tejidos. Las posibles aplicaciones que se derivan de esta nueva perspectiva han adquirido tal entidad que han dado lugar a un nuevo campo que ya ha sido bautizado como *Medicina Regenerativa.* Con seguridad, ha venido a conseguir tratamientos hasta hace poco simplemente insospechados.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES Y HUMANAS

En las dos últimas décadas, los métodos de cultivo de células y tejidos animales, así como la aplicación a los mismos de diversas tecnologías, han tenido un importante desarrollo favorecido por el hecho de que presentan numerosas ventajas frente a la investigación con animales vivos, no obstante hay que considerar también algunas desventajas (Freshney 2005).

Entre las principales ventajas que aportan los cultivos celulares para la experimentación están:

1. La posibilidad de mantener un control directo del medio físico-químico en el que se desarrollan las células. Diversos factores como el pH, la temperatura, O_2 y CO_2 disuelto en el medio, presión osmótica, nutrientes, etc. pueden ser controlados por el investigador, lo que permite el estudio de la fisiología de un tipo celular aislado, en numerosas situaciones.
2. La homogeneidad de comportamiento de las células en cultivo in vitro lo que permite el empleo de experimentos limitados para alcanzar resultados superponibles a los obtenidos con poblaciones animales mucho mayores.
3. Por lo anteriormente expuesto queda muy claro que la investigación con cultivos celulares reduce costes experimentales (y de utilización de animales) especialmente en determinadas áreas científicas especialmente onerosas (Farmacología, Toxicología, etc.).

No obstante, también hay que considerar algunos hechos que complican el desarrollo de estas técnicas. Como, por ejemplo, el que la propia complejidad técnica e instrumental, además de requerir una inversión en equipamiento y mantenimiento del mismo (en algún proyecto puede ser a un problema), suponga la necesidad de un entrenamiento técnico específico de los investigadores y del personal técnico. Desde el punto de vista biológico la restricción principal surge de que, en no pocas ocasiones, se aprecia una falta de estabilidad en el cariotipo celular lo que conlleva a la trasformación de las células que dejan de ser útiles para el estudio inicialmente planteado.

HISTORIA DE LOS CULTIVOS CELULARES[2].

UN ENTORNO HISTÓRICO

Al plantear un resumen sobre la historia del cultivo de células y tejidos lo primero es remontarse hasta los siglos XVII y XVIII, a los periodos conocidos como "el Barroco" y "la Ilustración", que han influido de forma decisiva en el conocimiento médico y científico europeo. Entonces se desarrollan los conceptos, y también las primeras técnicas, necesarias para los primeros avances de las Ciencias relacionadas con la Biología. También se plantearon las bases del método científico y se realizó el descubrimiento del microscopio óptico que, casi de inmediato, se utilizó en la investigación de la Naturaleza (Biología).

Los estudiosos que hasta el siglo XVII eran mucho más conservadores en sus planteamientos comenzaron corrientes inconformistas y de pensamiento crítico. La búsqueda de apoyos o datos conllevó el inicio de un intenso intercambio de conocimientos entre estos primeros investigadores que dio lugar a la creación de las primeras Sociedades Científicas. En el siglo XVIII la Ciencia y la Tecnología experimentaron un gran impulso dando lugar a una sociedad mucho más tecnificada que correría, desde entonces, paralela al desarrollo humano. En España Felipe V, Fernando VI y Carlos III fueron grandes valedores de estos avances, al punto que este periodo se ha denominada de la Ilustración Borbónica, en la que vieron la luz un buen número de instituciones científicas y culturales. Entre ellas destacan: el Jardín Botánico, el Observatorio Astronómico, o el Real Colegio de Medicina y Cirugía de San Carlos y las Reales Academias (Martín González 1994, Hernández Sandoica 1995).

EL MARCO CIENTÍFICO: TRES "PILARES" PARA UN POSIBLE DESARROLLO DE LOS CULTIVOS DE TEJIDOS

En el siglo XVIII será Von Haller, un científico alemán, quien en su libro "Elementa physiologiae corporis humani" exponga que a fibras y tejidos (definidos por Falopio como bases de los órganos), se les pueden aplicar las leyes físicas. Este planteamiento conllevaría el desarrollo del "método experimental" sustentado sobre todo en el famoso libro "Discur-

2 Para no hacer demasiado prolija esta parte se citan solo algunos de los trabajos utilizados para escribir este texto aunque el autor reconoce la utilización de otros muchos, especialmente Parker 1967, Albarracín 1983 a y b, Adolphe 1988, Wigley 1994, Freshney 1990, 2005 y otros que se citan en la sección Bibliografía Utilizada y Consultada.

so del Método" de Rene Descartes (1596-1650). Una frase tomada de este libro expresa su punto de vista con claridad: "Más valdría no pretender nunca buscar la verdad sobre ninguna materia que hacerlo sin método, ya que los estudios desordenados y las meditaciones confusas perturban las luces naturales y ciegan el espíritu" (Descartes 1974). Otro de los pilares importantes de este cambio hacia la Ciencia moderna iba a ser el desarrollo de la Yatroquímica (Ayuso, 1995b). Sus principios planteaban que los procesos orgánicos, fisiológicos y patológicos, podían ser explicados mediante reacciones químicas.

Uno de los avances muy relevantes de la Biología fue el desarrollo del microscopio sin el cual no era posible estudiar la estructura básica de los tejidos. Los primeros microscopios simples fueron diseñados por Jansen a finales del siglo XVI - principios del XVII. Antón van Leeuwenhoek (1632-1723) (Anónimo 1990) construyó un modelo de microscopio simple algo más potente con el que estudió algunos protozoos presentes en el agua, identificó los glóbulos rojos y algunas fibras musculares. En España, Crisóstomo Martínez (1638-1689), contemporáneo de Leeuwenhoek, realizó un excelente atlas de Anatomía con observaciones microscópicas (Bullón, 1976, 1977). Robert Hooke utilizando un microscopio compuesto definió de forma original, en secciones muy finas del tejido vegetal del corcho, la existencia de celdillas o células. Es uno de los hitos fundamentales para la Biología, la Citología y, por supuesto, para los futuros Cultivos Celulares. Malpighi (1628-1694) y Morgagni (1682-1771) estudiaron los tejidos e iniciaron su clasificación. Esa primera sistemática sería la base de la desarrollada por Jean Marie Bichat (1771-1802).

Unos años después Schleiden (1838), en los vegetales, y Schwann (1839), en los animales, confirmarían que el componente básico de todo ser vivo era la célula, la cual describen como compuesta por un magma o citoplasma rodeado por una membrana y centrado por un núcleo (Albarracín, 1983). Purkinje (1787-1869) descubre el núcleo celular del óvulo fecundado y de las células gástricas.

Uno de los grandes investigadores y pensadores científicos del siglo XIX sería Rudolf Virchow (1821-1902). Enunció su aforismo "omnis cellula e cellula" que sería, ni más ni menos, que la base de la Teoría Celular. En una frase, aparentemente tan obvia, quedaba encerrado el concepto de que todas las células proceden de otras previas y no de un "magma indiferenciado", que de alguna forma habían sugerido Schleiden y Schwann (Albarracín, 1983). Por su libro "Die Cellularpathologie" (1858) se considera que Virchow fue el "padre" de la Patología Celular. En esos años (1852), otro alemán, von Kölliker había publicado el primer tratado de Histología de corte moderno con el título "Handbuch der Gewebelehre des Menschen".

Pero todo lo descrito hasta aquí, de forma muy sucinta, no deja de hacer referencia al aspecto estructural de las células, aunque sin duda todos los investigadores extraían deducciones funcionales de sus observaciones. Las bases conceptuales de los cultivos celulares solo fueron posibles con el desarrollo de la fisiología celular.

En efecto, para el desarrollo conceptual y técnico de los Cultivos de células animales se requieren los conocimientos que aporta la Fisiología. Desde luego Claude Bernard (1813-1878) será considerado como el auténtico creador y primer promotor de esta ciencia por su definición del "medio interno" (Bert, 1878, Laín Entralgo, 1989). En su vasta obra

Bernard estudia además la secreción salivar, la fisiología del páncreas, la glicogénesis del hígado, la diabetes, la inervación vasomotora, la secreción interna, etc. Enuncia las bases de la experimentación en Fisiología y Farmacología que recoge en su libro "Introducción al estudio de la Medicina Experimental" (1865). Claude Bernard que en esencia sigue la filosofía positivista de Comte, discrepa de él en que, según Bernard, la Ciencia no puede prescindir, ni siquiera desde el punto de vista positivista, de lo que enseñan la filosofía especulativa (la ciencia del razonamiento de la etapa metafísica) o la religión (la ciencia de las creencias de la etapa teológica) (Laín Entralgo, 1989).

Como Tercer Pilar para la puesta en marcha de los Cultivos Celulares, tras los estudios microscópicos y el desarrollo de la Fisiología, se encuentran los conocimientos (conceptuales y técnicos) que aporta la Embriología. Es indudable su gran papel impulsor de las técnicas de los cultivos celulares.

Las numerosas cuestiones que surgieron del estudio de los embriones, imposibles de responder sólo con las técnicas embriológicas, supusieron un gran impulso a los estudios in vitro. En el siglo XVII, el médico e investigador William Harvey ya había planteado la Teoría Epigenista, opuesta al Preformacionismo, según la cual los embriones se desarrollan a partir de estructuras indiferenciadas que constituyen el huevo fecundado. Estos conceptos fueron ampliados por Wolf a mediados del siglo XVIII, pero no pudieron ser corroborados hasta la introducción del microscopio en Biología.

La Embriología recibió un notable impulso con los trabajos de Karl Ernst von Baer (1792-1876). Sus principales estudios se concentraron en identificar y definir las hojas germinativas de los embriones, describió el embrión bilaminar e intuyó algunos de los derivados de dichas hojas. En su obra "Ueber Entwicklungsgeschichte der Tiere" (1828-1837) enunció la "Ley Biogenética o de von Baer" según la cual el desarrollo embrionario es una progresiva expresión de los caracteres del individuo. Posteriormente fue Robert Remak (1845) el que identificó las tres hojas (ectodermo, endodermo y mesodermo) del embrión trilaminar. Desde mediados del siglo XIX a la actualidad la Embriología ha requerido analizar las causas del desarrollo embrionario (Embriología Causal) como complemento a la descripción de los procesos de diferenciación (Embriología Descriptiva) (Orts Llorca, 1975).

En este desarrollo ha tenido un papel fundamental la obra de Wilhelm Roux (1850-1924) con su Mecánica del Desarrollo (Bodemer, 1975). Precisamente la necesidad de demostrar la actividad celular y sus interacciones durante el desarrollo embrionario llevan a Roux a interesarse en el desarrollo células aisladas (fibroblastos de pollo) como complemento adecuado a sus estudios en Embriología.

COMENZANDO A CULTIVAR LOS PRIMEROS TEJIDOS: LOS "PRECURSORES"

La clasificación de la historia de los cultivos celulares en "periodos científicos" realizada por Adolphe (1988) resulta muy útil para encajar los diversos avances conceptuales y técnicos. Tomando este estudio como base se puede plantear una clasificación similar, pero con novedades y modificaciones que llevan a enunciar cuatro periodos fundamentales:

1. Periodo de los precursores (1866 y1907)
2. Periodo del cultivo de tejidos (1907 hasta 1950)
3. Periodo del cultivo de células disociadas (1952 hasta 1972)
4. Periodo de los ingenieros celulares (1972 a la actualidad)

En el *periodo de los precursores* destacaron los experimentos de von Recklinghausen (1866), que mantuvo in vitro células sanguíneas de anfibios, de Roux (1885), que analizó in vitro el cierre del tubo neural del embrión de pollo, o de Jolly (1903), quién estudió la mitosis de los leucocitos in vitro (citado por Parker 1967).

Todos estos estudios, y otros muchos, presentan aspectos comunes que nos permiten incluirlos dentro de una fase inicial del desarrollo de la técnica de cultivos. Su principal objetivo era analizar los efectos del cultivo sobre determinado tipo celular, lo cual es una característica común a todos los estudios in vitro de esta primera época. Se trataba sobre todo de evidenciar las modificaciones de células procedentes de organismos multicelulares cuando bruscamente eran situadas en condiciones de aislamiento del individuo vivo. Su otra característica es la de un desarrollo técnico muy preliminar. Los estudios con tejidos obtenidos mediante técnicas de disección relativamente groseras, los investigadores se conformaban con obtener secciones suficientemente pequeñas de los órganos que pretendían cultivar.

En tercer lugar, todos estos estudios se realizaron gracias a la utilización de "medios nutritivos" totalmente naturales sin apenas modificaciones. Según Parker (1968) los más empleados eran:

1. Medios sólidos o semisólidos como coágulos sanguíneos y de linfa, huevos de ave (o sus homogenados) o agar sobre los que se situaban los fragmentos de tejido.
2. Medios líquidos como linfa, suero sanguíneo, humor acuoso, o soluciones salinas.

En estos estudios se fueron introduciendo, de forma progresiva, algunas "novedades" de la época como la asepsia (procedente de la Cirugía), la cautela de conservar la humedad, la temperatura, etc. que eran conceptos vinculados a los primeros estudios de Fisiología.

EL PERIODO DEL CULTIVO DE TEJIDOS Y ÓRGANOS

El inicio de la *época del cultivo de tejidos* se debe a una aportación fundamental realizada por Harrison, publicada 1907, en la este autor utiliza los cultivos celulares como técnica adecuada para responder a una pregunta científica compleja surgida de la experimentación in vivo. Si bien Roux (1885), con técnicas de embriología experimental, ya había sido un precursor en este aspecto, llegando a demostrar que el tubo neural se cerraba por efecto de sus propias células y no por los tejidos circundantes (citado por Parker, 1967), fue con Harrison (1907) con quien se realizó el cambio fundamental de mentalidad. Ross Granville Harrison (1870-1959) fue un biólogo y anatómico norteamericano dedicado al estudio del sistema nervioso, cuyos estudios han tenido gran importancia en el desarrollo de la neurofisiología.

El claro interés de Harrison por la estructura y función del sistema nervioso le llevó a estar muy al corriente de los avances en esta área que se produjeron en Europa (en concreto en España e Italia, pero con el trasfondo de los anatómicos alemanes) a finales del

siglo XIX y principios del XX. Lo que Ramón y Cajal definiría como "la discrepancia sobre neuronismo o reticularismo en el tejido nervioso" (Ramón y Cajal 1952). Es precisamente en este periodo de intensa discusión científica sobre la estructura de los centros nerviosos y sobre las conexiones de las neuronas cuando se destaca la obra de D. Santiago Ramón y Cajal (1851-1934). Además de su descripción sistemática de la estructura, "textura" según expresión del propio Cajal, del sistema nervioso (Ramón y Cajal 1899, 1972), realiza numerosas aportaciones conceptuales sobre la independencia neuronal que supusieron un gran avance científico (Sanz Esponera 1985). Entre ellas cabe destacar las Leyes de la Polarización Dinámica y de la Conexión Específica de las Neuronas que, en 1906, le permitieron ser galardonado con el Premio Nobel. Son estos estudios los que hoy nos permiten enunciar sin ninguna duda que D. Santiago Ramón y Cajal fue el padre de la Neurobiología, tal y como hoy se entiende (Gallego 1985 a y b).

Pero aún en 1906 se mantenía una fuerte discrepancia entre los investigadores, y las Escuelas, sobre la estructura del sistema nervioso, mientras unos mantenían aún que era un sincitio los más suscribían la "teoría" de Cajal de que estaba constituido por una red de elementos celulares independientes. Esas células a las que Waldeyer denominaría "neuronas" en 1891. En este sentido Harrison (1907, citado por Baratas Díaz 1979) propuso que las técnicas de cultivos celulares podrían aportar alguna luz sobre la estructura del sistema nervioso y la individualidad de las células nerviosas (neuronas). Analizó la evolución in vitro de fragmentos de tejido nervioso de rana observando la capacidad de fasciculación de los axones, que demostraban ser fibras individuales (Parker 1967, Baratas Díaz 1979). Estos estudios apoyaban con claridad los estudios y publicaciones de Ramón y Cajal.

Las aportaciones de Harrison (1907, 1912) abarcaron también a la propia técnica de cultivo, dado el escaso desarrollo que aún se había alcanzado. Uno de los primeros problemas que se planteaban era la necesidad de mantener una temperatura de incubación del tejido que fuera suficiente y constante para permitir su desarrollo. La opción de utilizar una estufa en el concepto actual todavía era bastante remota, por ello Harrison opta por orientarse a la búsqueda el tejido que le pareció más adecuado. Así es como selecciona un animal poiquilotermo (la rana) en el supone que, en principio, sus tejidos deberían poder adaptarse a la temperatura media del ambiente en el que se encontrase (el laboratorio) tal y como hacen en la Naturaleza. Otro de los retos era la alimentación de las células en cultivo. Harrison utiliza algunas soluciones nutritivas, en concreto coágulos de plasma o de linfa, que se utilizaban en otros laboratorios (ver Parker 1967, Leyva-Cobián 1985). Se preocupó también por evitar la desecación del cultivo y por garantizar que el crecimiento celular tuviera un cierto anclaje al soporte, sobre todo cuando empleaba los famosos portas excavados. Evitar las contaminaciones, como aún sucede ahora, era la mayor batalla cotidiana de los que realizaban estas técnicas. Todos estos asuntos ocuparon buena parte del trabajo, y de las publicaciones, de Harrison en aquellos años lo que atrajo la atención de otros investigadores como veremos más adelante.

En esta primera década del siglo XX continuaba el avance científico en otros muchos campos, algunos de los cuales tendría repercusión sobre el desarrollo ulterior de las técnicas de cultivo. Cabe destacar que, entre los que más influyeron, se encuentra el diseño de la solución de Tyrode (1910) y el descubrimiento en 1916, por Prous y Jones, de la capacidad de la tripsina de disgregar fragmentos de tejidos.

Un gran impacto tendrían los estudios de Alexis Carrel que, desde 1910, comenzó a publicar algunos trabajos realizados con técnicas de cultivo de tejidos (Carrel y Burrows 1910, 1911). Carrel era entonces un cirujano vascular e investigador francés que trabajaba ene el Instituto Rockefeller (1906-1939, citado por Leyva-Cobián 1985) y que iba a recibir el Premio Nobel (1912) por sus avances sobre la sutura vascular y técnicas para el trasplantes de vasos sanguíneos, etc. (Fresquet 2004). Había tenido la oportunidad de conocer a Harrison y de aprender las técnicas in vitro que éste utilizaba. Decidió iniciar, con algunos colaboradores, diversos trabajos experimentales comenzando por el desarrollo de tejido conjuntivo (fibroblastos) de embrión de pollo (Fresquet 2004). Es evidente que el fin último de sus estudios in vitro, que abarcaron hasta 1946, era su posible aplicación en Cirugía. En 1938 publicó el libro "The Culture of Organs" con Charles A. Lindberg (editado por Paul B. Hoeber, Inc.) de gran impacto científico e incluso general, hasta el punto que fue portada de la revista Time el 13 de junio de1938.

Cultivo primario: **se define como el que se desarrolla a partir de un tejido procedente directamente de un animal pluricelular. Contiene varios tipos celulares. Para su obtención sólo se emplea la disección mecánica superficial.**

Alexis Carrel contribuyó de forma notable al desarrollo de numerosos aspectos complementarios de las técnicas de cultivos celulares, algunos de los cuales aún permanecen en uso (Adolphe 1988, Leyva-Cobián 1985, Fresquet 2004). Entre sus aportaciones más relevantes destacan:

1. La mejora de las técnicas de obtención y disección fina de los tejidos para evitar traumatismos innecesarios que los dañaran (técnica de Carrel)
2. La aplicación de las técnicas de asepsia, que Carrel conocía de su trabajo como cirujano.
3. El estudio y diseño de numerosos recipientes idóneos (frascos y botellas de Carrel, etc.) para el mantenimiento del cultivo. En este sentido hizo algunas aportaciones con Gey en 1933.
4. Contribuyó de forma significativa a la obtención de medios de cultivo y de los primeros "factores de crecimiento", algunas de estas observaciones las publicó con Burrows (Carrel y Burrows 1911).
5. Puso en marcha un laboratorio con un numeroso grupo de seguidores y colaboradores que continuó sus trabajos durante décadas.

Cultivos tridimensionales: **Los que mantienen, de forma natural o artificial, la estructura del tejido. Si utilizan órganos completos (de pequeño tamaño) o fragmentos se denominan cultivos de órganos (nomenclatura USA), pero en la literatura francesa se suelen llamar cultivos organotípicos ("culture organotypique" = cultivo primario) (Adolphe 1988). El problema es que este término, utilizado en inglés ("organotypic culture"), se reserva en el mundo anglosajón para denominar a la reasociación artificial de células, procedentes de distintas líneas celulares (cultivo secundario), que se integran en una malla artificial (Freshney 1990). A pesar de ello ambas tendencias coinciden al definir el cultivo histotípico ("histotypic culture") como reasociación artificial de células de un solo tipo que proceden de un cultivo previo (Freshney 1990)**.

Los estudios de Alexis Carrel (1912) se desarrollaron utilizando el modelo de cultivo de órganos y tejidos. El *cultivo de órganos,* del que puede considerarse como precursor a Roux (1885), se desarrolló inicialmente con los trabajos de Harrison (1907) y Carrel (1912). Las técnicas de cultivo de tejidos y órganos han tenido una aplicación muy amplia en la embriología (Strangeways y Fell 1926, Wolff y Halfen 1952, citados por Michiels, 1988, Van de Water 1971 citado por Gil-Loyzaga, 1991), en estudios de diferenciación celular (Gil-Loyzaga y cols. 1992), para analizar la acción de las hormonas sobre diferentes tejidos (Gaillard 1938), o para la síntesis de matrices extracelulares (Gil-Loyzaga y cols. 1991).

EL PERIODO DEL CULTIVO DE CÉLULAS DISOCIADAS

El inicio del periodo de *cultivos de células disociadas*, también llamado de "cultivos celulares", es muy poco concreto (trabajos citados por Parker 1967 y Michiels 1988). Aunque la utilización sistemática de soluciones enzimáticas para disociar las células se retrasó bastante, lo cierto es que desde los años treinta ya se había publicado que las células, al menos las tumorales, podían cultivarse individualizadas. Los primeros datos concretos proceden de Gey (Gey 1933) que identifica la disgregación espontánea de las células de los tumores malignos en situación de cultivo in vitro. Este hallazgo se debe a que las células de trasformadas cancerosas tienden a la disociación natural, por un lado porque por su escasa diferenciación carecen de estructuras de membrana celular que las mantengan unidas, por otra parte esta capacidad les permite la invasión de los tejidos circundantes y la metástasis, en búsqueda de nutrientes para mantener su alto nivel metabólico y de multiplicación celular.

Este hallazgo permitió comprender también que, con las técnicas adecuadas, se podían mantener células eucariontes, procedentes de pluricelulares, en cultivo en vitro. Uno de los primeros en realizar la incubación de tejidos en soluciones de tripsina a diferentes concentraciones debió ser Moscona (1952), obteniendo así cultivos de células disociadas "artificialmente" (Adolphe 1988). Posteriormente, se han ido introduciendo otras muchas enzimas no solo con fines de disociación celular como la tripsina, la colagenasa o la pronasa, sino también para mejorar los propios cultivos, como la DNAasa (ver Capítulo 20). Nuevos estudios permitieron a Scherer, Syverton y Gey (1953) el cultivo de células tumorales dispersadas mediante estos métodos para el estudio y multiplicación del virus de la poliomielitis.

Cultivo de células disociadas: **Es una variable de cultivo primario, obtenido de un tejido vivo del cual las células han sido disociadas por medios mecánicos enérgicos y/o por medios enzimáticos. Se obtienen suspensiones celulares que se cultivan.**

Siembra: **Maniobra para depositar en una placa las células procedentes de la disociación de un tejido que ha sido aislado de un pluricelular.**

Uno de los aspectos fundamentales en la historia los cultivos celulares ha sido la posibilidad de definir células estables de cariotipo homogéneo que se mantenga a lo largo del tiempo. Esta situación es la que mejor define las líneas celulares. Los primeros intentos

fueron realizados por el propio Carrel (entre 1914 y 1931) trabajando con fibroblastos de embrión de pollo, siendo Scherer, Syverton y Gey los que desarrollaron la línea celular de células HeLa, denominadas así por la paciente Henrietta Lacks que hizo donación de las células de un cáncer de cuello uterino que padecía. Con estos estudios se iniciaba, por primera vez en la historia, una de las primeras aplicaciones biomédicas claras de los cultivos celulares. Ya que estas células sirvieron, durante la gran epidemia de poliomielitis de la década de 1940 a 1950, para el estudio de los virus y su comportamiento y para la preparación de vacunas anti-poliomielitis. En esa misma época otros investigadores como Frisch y Jentoft (1953) utilizaron la técnica de disociación por tripsina para cultivo de células de testículo de mono, o Younger (1954) para cultivar células de riñón de mono.

Cultivo secundario **es el que utiliza células o tejidos que han sido desarrollados en un primer cultivo, o segundo o tercero etc., que son sembrados de nuevo para un siguiente cultivo.**

Resiembra: **Es la técnica para transferencia de células de un cultivo a otro. Se utiliza en el desarrollo de las líneas celulares.**

Pero el estudio de las líneas celulares también ha permitido notables avances en la biología normal como por ejemplo conocer el límite de vida de las células diploides, por lo menos en su situación in vitro (Hayflick y Moorhead 1961).

El equipo de Enders, Weller y Robbins contribuyó de forma muy significativa a estos estudios desde mediados de la década de los ‘40, cultivando el virus de la polio en diversos tipos de tejido diferente al nervioso (pulmón etc.), motivo por el que recibieron el Premio Nobel en 1954. También fueron de los primeros en desarrollar el cultivo en suspensión y en “roller” de diversas células disociadas, inaugurando así un nuevo tipo de cultivo celular.

Tipos de cultivos de células disociadas: 1) *Cultivos estacionarios* **o en monocapa son aquellos en los que las células se reproducen fijadas a un soporte. Se utiliza para células dependientes de fijación a substrato. 2)** *Cultivos en suspensión:* **son los que se realizan en botellas y suelen realizarse con células de estirpes eritro, leuco o linfopoyéticas y con distintos tipos de células tumorales malignas. Se utiliza para células independientes de fijación a substrato.**

Otros avances han permitido un amplio desarrollo de los cultivos celulares, es especial: 1) el desarrollo y perfeccionamiento de medios de cultivo y factores de adhesión debido, sobre todo, a Dulbecco, Eagle, Earley, Hanks, etc. (ver por ejemplo: Eagle 1959), 2) el establecimiento de líneas celulares a partir de fibroblastos de embrión de pollo (comenzados por Carrel) o de ratón (Earle 1943), tumores humanos (células HeLa: Scherer y cols. 1953) o cultivos de líneas finitas (Hayflick y Moorhead, 1961), 3) el desarrollo de protocolos y procedimientos para la congelación de células. Para ello fue necesario el casi revolucionario descubrimiento de Polge, Smith y Parkes (1949) de que el glicerol protegía a las células de los daños que podría causar la congelación (Aswood-Smith y cols. 1979). A partir de entonces se han analizado las posibilidades de congelación de las células a –196°, lo cual ha permitido estabilizarlas durante décadas (Capítulo 7). Esta técnica ha contribuido sin duda al desarrollo de las líneas celulares. Por ejemplo la línea de células HELA que fue

establecida en 1952 y cuyas células, conservadas desde entonces, permanecen útiles y accesibles para la investigación.

Línea celular: **Cultivo de células que proceden de un cultivo primario y que pueden ser transferidas a nuevos cultivos. Se denomina *línea celular continua* a aquella que se puede mantener largos periodos de tiempo (células He-La), y *línea celular finita* a aquella que tras varias pasos degenera progresivamente.**
Cepa celular: **Grupo de células con propiedades metabólicas e inmunológicas similares que derivan de un cultivo primario.**
Clon celular: **Grupo de células con propiedades metabólicas e inmunológicas idénticas que derivan de una única célula.**

Muchos son los avances ulteriores que se podrían incluir dentro de este periodo de "los cultivadores de células" pero baste citar aquí solo uno más, que ya se encuentra claramente entre esta fase científica y la siguiente. Se trata de que una vez que ya se conocen las técnicas y posibilidades de desarrollo in vitro de las células disociadas el paso lógico siguiente es intentar reagruparlas en estructuras tridimensionales artificiales. La idea final sería la de reconstruir órganos a partir de células desarrolladas in vitro y que, procedentes del propio paciente, pudieran ser útiles para transplante sin problemas de rechazo inmunológico, ni de otros tipo. Estos trabajos avanzan lentamente desde los primeros estudios de microcarriers desarrollados por Van Wezel en 1960, con los conocidos "microcarriers".

EL PERIODO DE "LOS INGENIEROS CELULARES"

Con estos primeros trabajos de reagregación celular artificial arrancan el último periodo que se ha dado en denominar como "de los ingenieros celulares", dado que sus múltiples objetivos se orientan a la posibilidad de manipular células (genéticamente o no), generar quimeras, intervenir sobre la producción tanto de células como de sus productos, etc. En los años 1970 se produce el conocimiento y desarrollo de las técnicas de ADN recombinante. Desde ese cambio sustancial en el concepto y las técnicas de Biología se puede considerar que la capacidad de intervenir genéticamente sobre las células ha modificado totalmente el clásico concepto de estabilidad de cariotipo de tiempos precedentes.

Para las técnicas de cultivo de tejidos y células los cambios introducidos en esta fase a partir de esas nuevas ideas han sido muchos, pero también han contribuido de forma notable: el desarrollo de nuevos medios, como los medios definidos y libres de suero, la identificación de numerosos factores tróficos, matrices artificiales, biorreactores para utilización industrial de cultivos celulares y cultivo a gran escala, el cultivo de células madre, los biochips, etc.

Un avance muy relevante proviene de los trabajos preliminares de Harris y Watkins (1965) que demuestra la posibilidad de obtención de células híbridas procedentes de la fusión de otras previas. La obtención de los hibridomas se debe a Kohler y Milstein (1975) que aprovechan las características complementarias de dos células similares mediante su fusión y recombinación genética. Mientras las células del tumor de médula ósea, denominado mieloma, tienen la capacidad de reproducción continua (equivalente a lo inmortalidad) y

de la producción masiva de gammaglobulinas inespecíficas, los linfocitos B sensibilizados frente a un antígeno concreto sintetizan anticuerpos específicos contra dicho antígeno. La fusión desarrollada en ratón de células de mieloma y linfocitos sensibilizados permite obtener células híbridas de alta capacidad reproductiva y prácticamente carentes de envejecimiento. Los anticuerpos obtenidos tienen la especificidad de los de los linfocitos de los que son copias exactas, pero producidos en cantidades de aplicación industrial.

Como se analiza también el Capítulo 23 uno de los nuevos retos de las técnicas de cultivo celular es el que se ha abierto al poder obtener células muy indiferenciadas (madre o troncales), cuya diferenciación puede obtenerse por inducción artificial en cultivo in vitro. La "reorientación" celular puede realizarse en el sentido más conveniente para el tratamiento de una enfermedad degenerativa o tumoral. A partir de esta posibilidad se están desarrollando las técnicas de terapia celular que constituyen la base de la Medicina Regenerativa, al que se dedica una parte significativa de este libro.

La utilización industrial y terapéutica de los cultivos celulares, tanto para obtención de vacunas, anticuerpos, hormonas, etc. son los desarrollos más recientes de las técnicas de cultivo celular. Por poner un ejemplo de su utilidad, en Estados Unidos desde el año 2004 el Plan Nacional USA para la Prevención de la Gripe sólo contempla la posibilidad de desarrollo de vacunas a partir de células in vitro (National Pandemic Influenza Preparedness and Reponse Plan, USA).

BIBLIOGRAFIA UTILIZADA Y RECOMENDADA

1. Adams RLP. Cell Culture for Biochemists. Lab. of Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Work TS & Burdon RH Eds. Elsevier. Amsterdam (1980).
2. Adolphe M, Barlovatz-Meimon G. Techniques en culture de cellules animales. Methodologies. Applications. Ed. INSERM. Paris. (1988)
3. Adolphe M, Guillouzo A, Marano F. Toxicollogie cellulaire in vitro. Méthodes et applications. Ed. INSERM. Paris. (1995)
4. Albarracín A. La Teoría Celular. Alianza Universidad. Madrid. (1983)
5. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Biologie Moleculaire de la Cellule. Flammarion Medecine Sciences. Paris. (1983)
6. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Biologia Molecular de la Celula (2ª ed.). Ed. Omega, S.A. Barcelona. (1994)
7. Anómino. Antonio de Leeuwenhoek, el primero de una larga saga. El Médico (1/12/1990).
8. Aswood-Smith MJ, Friedmann GB. Lethal and Chromosomal Effects of freezing, thawing, storage time and x-ratiation on mammalian cells preserved at -196°C in dimethylsulfoxide. Cryobiology 1979:16:132-140.
9. Ayuso Arroyo PP. Una Historia de la Otorrinolaringología. Cap. VI. La Revolución Científica. Vertere. 1995:9:29-31.
10. Banker G, Goslin K. Culturing Nerve Cells. MIT Press. Cambridge. (1992)
11. Baratas Díaz LA. La obra neuro-embriológica de Santiago Ramón y Cajal. DYNAMIS. Acta Hisp. Med. Sci. Hist. Zllus. 1997:17:259-79.
12. Baserga R. Cell Growth and Divison. A practical Approach. Oxford Univ. Press. IRL Press. Oxford (1992)

13. Baumann N Brain Cell Cultures- A tool in Neurobiology. Devl Neuroscience 1985:7: 252-397.
14. Bernard C. Introducción al estudio de la medicina experimental (1865). Librería-Editorial "El Ateneo" Buenos Aire. (1959).
15. Bert P. Claude Bernard. En "Introducción al estudio de la medicina experimental". C. Bernard (1878). Edit. El Ateneo. Buenos Aires. 1959:19-24.
16. Bodemer CW. La Embriología. En: Historia Universal de la Medicina. P. Laín Entralgo.Salvat, Barcelona. 1975. vol 6. 47-55.
17. Bullón A. Sobre los orígenes de la Anatomía Patológica en España. Biométrica 1976:1/2:97-106.
18. Bullón A. La Anatomía Patológica en España. Pathologica 1977:69:229-242.
19. Butler M. Animal Cell Culture and Technology BIOS Scientific Publ (2004). ISBN: 1859960499.
20. Carrel A, Burrows MT. Cultivation of adult tissues and organs outside the body. J Am Med Ass. 1910:55:1379-81.
21. Carrel A, Burrows MT. Cultivation of tissues in vitro and its technique. J Exp Med. 1911: 13/3:387-96.
22. Cohen J, Wilkin GP. Neural Cell Culture: A Practical Approach (Practical Approach Series). Oxford University Press, USA. (1996) ISBN: 019963484X
23. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. Biología Celular y Molecular. Ed. Omega. Barcelona. (1993)
24. Davis JM. Basic Cell Culture. Practical Approach Series. Oxford University Press, USA. (2002) ISBN: 0199638535
25. Descartes R. Discurso del método. Biblioteca Clásica y Contemporánea. Losada. Buenos Aires. (1974)
26. Doyle A, Griffiths JB. Mammalian Cell Culture: Essential Techniques. John Wiley & Sons. (1997) ISBN: 0471970573
27. Eagle H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science 1959:130:432-7.
28. Earle WR. Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in living cells. J. Nat. Cancer Inst. 1943:4:165-212.
29. Fedoroff S, Richardson A. Protocols for Neural Cell Culture. Humana Press. Totowa NJ. (1993)
30. Fedoroff S, Richardson A. Protocols for Neural Cell Culture. 2nd ED. Humana Press. Totowa NJ. (1997)
31. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Wiley-Liss. New York. (1987)
32. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Wiley-Liss. 2nd Ed. 3rd Pr. New York. (1990)
33. Freshney RI. Animal Cell Culture. A practical approach. Oxford University Press. UK. (1992)
34. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Wiley-Liss (2005) ISBN: 0471453293.
35. Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM. Culture of human stem cells. Wiley-Liss. (2007) ISBN: 0470052465.
36. Fresquet JL. Alexis Carrel (1873-1944). Instituto de Historia de la Ciencia y Documentación (Universidad de Valencia-CSIC). Julio 2004. http://www.historiadelamedicina.org/carrel.html

37. Frisch AW, Jentoft V. Use of trypsin in preparing subcultures of monkey testicular tissue. Procs. Soc. Exp. Biol. Med. 1953:82/2:322-3.
38. Gallego A. Cajal, cincuenta años después. JANO 1985(a):657:23-24.
39. Gallego A. Teoría de la neurona y conexión general de los elementos nerviosos JANO 1985(b): 658:35-40.
40. García del Moral R. Laboratorio de Anatomía Patológica. McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid. (1993)
41. Gey GO. An improved technic for massive tissue cultures. Am. J. Cancer 1933:17:752-6.
42. Gil-Loyzaga P, Pujol R Kainic acid toxicity on cochlear type I neurons. Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery. Kugler & Ghedini Publications. Amsterdam. 1990:37-39.
43. Gil-Loyzaga P, Gabrion J, Remezal M, Nguyen-Than-Dao B, Uziel A. Incorporation of D-^{3}H-glucosamine and L-^{3}H-fucose into the developing rat cochlea. Hearing Research 1991:57: 38-44.
44. Gil-Loyzaga P, Remezal M, Oriol R. Neuronal influence on B and H human blood-group antigen expression in rat cochlear cultures. Cell and Tissue Research 1992:269: 13-20.
45. Harris H, Watkins JF. Hybrid Cells Derived from Mouse and Man : Artificial Heterokaryons of Mammalian Cells from Different Species Nature 1965:205:640-6
46. Harris CC, Trump BF, Stoner GD. Normal Tissue and Cell Culture. Methods in Cell Biology 21. Academic Press. New York. (1980)
47. Harrison RG. Observations on the living developing nerve fiber. Anatomical Record. 1907:1: 5. (citado por Baratas Díaz 1997).
48. Harrison RG. The cultivation of tissues in extraneous media as a method of morphogenetic study. Anatomical Record. 1912:6:141-9.
49. Harrison MA, Rae IF. General Techniques of Cell Culture. Cambridge University Press. ISBN: 052157496X (1997).
50. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1961:25:585-621.
51. Helgason CD, Miller C. Basic Cell Culture Protocols. Humana Press. 2005 ISBN: 1588295451. 371 pg
52. Hernández Sandoica E. Dos modelos de Universidad y una sóla trayectoria histórica: el traslado de la Universidad de Alcalá de Henares a Madrid. En: La Universidad Complutense y las Artes. VII Centenario de la Universidad Complutense. Servicio de Publicaciones U.C.M. 1995:279-291.
53. Jones GE. Human Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Medicine). Humana Press. (1996) ISBN: 089603335X.
54. Kemp RB, Hichliffe JR. Matrices and Cell Differentiation. Progress Clinical & Biologycal Res. 15. Alan R. Liss. New York. (1984)
55. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975:256:495-7
56. Laín Entralgo P. Historia Universal de la Medicina. Vols. I-VII. Ed. Salvat, Barcelona. (1975)
57. Laín Entralgo P. Más sobre nuestra Ciencia. Hacia el futuro: El Estado. JANO 1988:35/823: 115.
58. Laín Entralgo P. Claude Bernard: anverso. JANO 1989:36/862:107
59. Landmesser LT. The Assembly of the Nervous System. Alan R. Liss. New York. (1989)
60. Leyva-Cobián F. Los cultivos celulares in vitro: cien años después. Inmunología 1985:4/3: 85-87

61. Marchal N, Bourdon JL, Richard CL. Les Milieux de Culture. Doin Editeurs París. (1991)
62. Martín González JJ. Introducción. VII Centenario de la Universidad Complutense. Edita Centro Cultural de la Villa de Madrid. 1994:15-26.
63. Masters JRW. Animal Cell Culture: A Practical Approach. Oxford University Press, USA. (2000) ISBN: 0199637962
64. Palsson B, Masters J. Human Cell Culture, Volume III: Cancer Cell Lines, Part 3: Leukemias and Lymphomas (Human Cell Culture). Springer. ISBN: 079236225X. 384 págs. (2000)
65. Martin BM. *Tissue Culture Techniques: An Introduction*. Edit. Birkhauser (Boston). USA. ISBN. 0-8176-3643-9 247 págs. (1994)
66. Mather JP, Barnes D. Animal Cell Culture Methods. Methods in Cell Biology. vol. 57. Academic Press. ISBN: 0124800408. (1998)
67. Mayer RJ, Walker JH Immunochemical Methods In Cell and Molecular Biology. Academic Press. San Diego. (1987)
68. McKay I, Leigh I Growth factors. IRL Press. Oxford. (1993)
69. Michiels FM Cas particulier de la culture organotypique. En: Techniques en culture de cellules animales. Methodologies. Applications. Adolphe M, Barlovatz-Meimon G (Eds). Ed. INSERM. Paris. 1988: 29-37
70. Milligan G. Signal Transduction. A Practical Approach. Oxford University Press UK. (1992)
71. Moscona A. Cell suspensions from organ ridiments of chick embryos. Exp. Cell Res. 1952:3: 535-9
72. Moscona AA, Monroy A. Neural Development. Part IV. Cellular and Molecular Differentiation. Academic Press. London (1987).
73. Orts Llorca F. Embriología. En: Laín Entralgo, P (ed). Historia Universal de la Medicina. Salvat. 1975:7:35-39.
74. Otis EM, Brent R. Equivalent age in mouse and human embryos. Anat Rec 1954:120: 33-53.
75. O'Rahilly R, Bossy J, Müller F. Introduction a l'etude des stades embryonnaires chez l'homme. Bull Assoc Anatom 1981:65: 5-99.
76. Paul J. Cell and Tissue Culture. 5th Ed. Livingstone. Edingburg. (1980).
77. Parker RC. Métodos de Cultivo de los Tejidos y las Células. Atika SA. (1967)
78. Pfeiffer SE. Neuroscience approached through cell culture (vol. II) CRC Press. Florida. (1983).
79. Pfragner R, Freshney R. Culture of Human Tumor Cells. Wiley-Liss ISBN: 0471438537. (2003)
80. Picot J. Human Cell Culture Protocols. Humana Press. ISBN: 1588292223. (2004)
81. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 1949:164:666-8.
82. Pollard JW, Walker JM. Animal Cell Culture. Humana Press. Clifton. New Jersey. (1990)
83. Prakash M. Cell and Tissue Culture. Anmol Publications. Ltd. ISBN: 8174887571 (2003).
84. Radbruch A. Flow Cytometry and Cell Sorting. Springer Verlag New York. USA. (1992)
84. Ramón Cajal S. Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados. Imprenta y Librería de Nicolás Moya Madrid. (1899).
86. Ramón y Cajal S. ¿Neuronismo o reticularismo?. Las pruebas objetivas de la unidad anatómica de las células nerviosas. CSIC. Instituto Ramón y Cajal. Madrid. (1952).
87. Ramón y Cajal S. Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés. CSIC. Inst. Ramón y Cajal. Madrid. (1972).
88. Regueiro JR, López-Larrea C. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. Ed. Panamericana. Madrid. (1996)

89. Remezal M, Gil-Loyzaga P. Incorporation of D ^{3}H glucosamine to the adult and developing cochlear tectorial membrane of normal and hypothyroid rats. Hearing Research 1993:66:23-30.
90. Robbins FC, Weller TH, Enders JF. Studies on the cultivation of polyomielitis viruses in tissue culture. II. The propagation of polyomilelitis viruses in roller-tube cultures of various human tissues. J Immunol. 1952:69/6:673-94
91. Roitt I. Essential Immunology. Blackwell Scientific Publications. Oxford. London. (1988).
92. Sanz Esponera J . Cajal y la teoría neuronal. JANO 1985:658:33-36.
93. Schaeffer WI. Propossed usage of animal tissue culture terms. Usage of vertebrate cell, tissue and organ culture terminology. In Vitro 1979:15: 649-653.
94. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant cells (strain HeLa) derived from a epidermoid carcinoma of the cervix. J Exp Med. 1953:97/5:695-710.
95. Shahar A, Filógamo G, Vernadakis A. A cookbook for culturing neuronal and glial cells. International Society for Developmental Neuroscience. University of Chiety, Italy. (1984)
96. Shahar A, Vellis J, Vernadakis A, Haber B. A dissection and tissue culture. Manual of the nervous system. Alan R. Liss. New York. (1989)
97. Sitkovsky MV, Henkart PA. Cytotoxic Cells. Birkhauser Secaucus NJ. (1993).
98. Slavik J. Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology. CRC Press. Florida USA. (1994).
99. Steward O. Principles of Cellular, Molecular, and Developmental Neuroscience. Springer-Verlag NY (1989).
100. Strange K. Cellular and molecular physiology of cell volume regulation. CRC press. Boca Raton. (1994).
101. Studzinski GP. Cell growth and apoptosis. IRL Press. Oxford. (1995).
102. Sullivan S, Cowan CA, Eggan K. Human Embryonic Stem Cells: The Practical Handbook. Editorial Wiley (2007) 424 pages
103. Swartz WJ. Early mammalian embryonic development. Am J Industrial Med 1983:4: 51-61.
104. Thomson AW. The Cytokine Handbook (2 Ed) Academic Press San Diego USA. (1994)
105. Van Wezel AL Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. Nature, 1967:216:64-5.
106. Vinci VA, Parekh SR. Handbook of Industrial Cell Culture: Mammalian, Microbial, and Plant Cells Humana Press. ISBN: 1588290328 537 págs (2002).
107. Vunjak-Novakovic G, Freshney RI. Culture of Cells for Tissue Engineering (Culture of Specialized Cells). John Wiley & Sons Inc. ISBN: 0471629359. (2006)
108. Weller TH, Enders JF, Robbins FC, Stoddard MB. Studies on the cultivation of polyomielitis viruses in tissue culture. I. The propagation of polyomilelitis viruses in suspended cell cultures of various human tissues. J Immunol. 1952:69/6:645-71.
109. Wigley CB. The cell culture laboratory. En: JM Davis, Ed. Basic cell culture: a practical approach. Oxford Univ. Press. 1994. págs.1-26.
110. Winlow W, McCrohan CR. Growth and plasticity of neural connections. Manchester University Press. Manchester. UK. (1987)
111. Wolpert L. The triumph of the embryo. Oxford University Press. Oxford-New York. (1992)
112. Wolff JR, Sievers J, Berry M. Mesenchymal-Epithelial Interactions in Neural Development. NATO ASI Series. Springer Verlag. Berlin. (1987).
113. Younger JS. Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin dispersed monkey kidney cells. Proc. Soc. exp. Biol Med. 1954:85:202-5.

CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES Y HUMANAS.
APLICACIONES EN MEDICINA REGENERATIVA
Editorial Vision Libros. Madrid (2011)
ISBN: 978-84-9983-737-6

CAPÍTULO 2

Estructura general de un laboratorio de cultivos celulares. Equipamiento esencial para las técnicas de cultivos celulares

Francisco Carricondo Orejana, Pablo E. Gil-Loyzaga

Departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología.
Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

Un laboratorio de cultivos celulares se constituye como un lugar de características propias y únicas debido a los requerimientos necesarios para llevar a cabo la obtención, el cultivo y el mantenimiento de las células *in vitro*. Por ello, la mayor parte del equipamiento utilizado se diseña, específicamente, teniendo en cuenta los requerimientos para realizar estas técnicas e, incluso, la misma estancia física del laboratorio de cultivos celulares es diseñada y ubicada, también específicamente, para la realización de los cultivos celulares.

La característica más importante de los cultivos celulares, sobre la cual pivotan tanto el diseño como la ubicación del laboratorio y los equipos a utilizar, es el mantenimiento de la asepsia necesaria para la obtención de cultivos celulares libres de cualquier tipo de contaminación, principalmente microbiana y fúngica, que pueda impedir o alterar el normal comportamiento de las células en cultivo. Conseguir este objetivo de asepsia general en el laboratorio de cultivos celulares depende de muchos factores pero tanto el diseño del laboratorio, la ubicación de los equipos en el mismo como el uso y mantenimiento adecuado de los mismos son la base para poder realizar los cultivos celulares de manera adecuada.

En este capítulo se expondrá un resumen del fundamento y características de los equipos de un laboratorio de cultivos celulares y por último, una vez conocido el equipamiento, se pasará a conocer la estructura de un laboratorio de cultivos celulares y como se realiza el diseño y ubicación de este equipamiento en el mismo.

EQUIPAMIENTO DE UN LABORATORIO DE CULTIVOS CELULARES

Como ya se ha comentado anteriormente, existe una gran variedad de equipos que son utilizados en el laboratorio de cultivos celulares, algunos de ellos específicos de cultivos y otros de uso general en laboratorio. Así, tenemos cabinas de flujo laminar, incubadores de CO_2, instrumentos ópticos de observación del cultivo como lupas de microcirugía,

microscopios invertidos y/o convencionales y equipamiento fotográfico, neveras y congeladores, equipos de esterilización como los autoclaves, baños termostatizados, centrífugas, contadores electrónicos de células, equipo de purificación de agua, balanzas, pH-metro, pipeteadores, etc. Todos ellos son necesarios de un modo u otro para la realización de los cultivos celulares, pero en este capítulo nos detendremos sobre todo en aquellos que por su especificidad son básicos en el laboratorio de cultivos celulares.

A) CABINAS DE FLUJO LAMINAR

El área de trabajo para realizar cultivos debe instalarse en una parte del laboratorio tranquila, alejada de las vías de paso y a ser posible dedicada exclusivamente al cultivo de células. Por ello, la solución ideal podría ser una habitación aislada en la cual conseguir el ambiente de esterilidad requerido para realizar los cultivos celulares con seguridad. Esto no es siempre posible debido, entre otras cosas, a restricciones de espacio o de presupuesto de los laboratorios. La gran complejidad en la creación y el mantenimiento adecuado de un área de trabajo estéril para realizar los cultivos celulares en condiciones asépticas hizo que se optase por una solución más viable con el desarrollo de cabinas que permiten la realización del trabajo con los cultivos celulares en un área estéril. Estas cabinas especiales, con la propiedad común de crear una zona de trabajo exclusiva y estéril para poder trabajar con las muestras de cultivo, son las cabinas de flujo laminar. Gracias a ellas, se redujeron las necesidades de aislamiento del laboratorio de cultivos celulares, pero aún así sigue siendo recomendable situar estas cabinas en una habitación aislada en la que se pueda mantener un gradiente de esterilidad, desde el medio exterior o laboratorio general al interior de las cabinas de flujo laminar, en las que se manipularán los cultivos, y del incubador de CO_2 donde se mantendrán los mismos. Por todo ello, las cabinas de flujo laminar se han convertido en elementos imprescindibles en el laboratorio de cultivos celulares.

Se las denomina de flujo laminar, porque basan la esterilidad del área de trabajo en el aporte, sobre la misma, de un flujo de aire laminar (sin turbulencias en las que puedan quedar retenidas partículas contaminantes) y estéril sobre la superficie de trabajo. La esterilidad del flujo de aire se consigue mediante el filtrado del aire del laboratorio a través de un filtro especial denominado filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air Filter* o filtro de partículas de aire de alta eficacia) que es capaz, con una eficiencia del 99,9%, de retener todas aquellas partículas de un calibre superior a 0,2 μm. El diseño de estos filtros fue desarrollado en la Segunda Guerra Mundial para evitar la dispersión de partículas radioactivas desde las salidas de gases de los reactores nucleares, pero hoy día es una tecnología habitual que está presente en vehículos, electrodomésticos, etc. El flujo de aire laminar permite que no haya turbulencias que introduzcan partículas contaminantes desde el ambiente del laboratorio hacia el área de trabajo estéril en el que se manipulan los cultivos. Las cabinas de flujo laminar suelen llevar una lámpara de vapor de mercurio que permite la radiación de la superficie de trabajo con rayos UV para la esterilización de la misma, cuando no está operativa, aunque también se utilizan para la polimerización de determinadas sustancias que formarán los sustratos de los pocillos de cultivos, como la poli-L-lisina.

El diseño general de las cabinas de flujo laminar que se utilizan en cultivos celulares permite dividirlas en tres categorías: de flujo laminar horizontal, vertical y cabinas selladas

o de seguridad, de las cuales son las de flujo laminar horizontal y vertical las que más se utilizan en cultivos (Figura 2-1). La diferencia básica entre ambos tipos es la dirección del flujo laminar de aire que ofrecen siendo, en las horizontales, un flujo de aire laminar horizontal desde el fondo de la cabina hacia el operador y vertical desde la parte superior de la cabina hacia el área de trabajo en las cabinas de flujo laminar vertical (Figura 1). Aunque ambos tipos basan la esterilidad del área de trabajo en el filtrado del flujo laminar de aire a través de un filtro HEPA, la dirección desde la que proviene el flujo laminar de aire permite ofrecer distintos niveles de seguridad tanto para el operador como para el cultivo.

En general, las cabinas de flujo laminar horizontal ofrecen muy buena seguridad para el cultivo pero poca para el operador, ya que el flujo laminar de aire viene desde el fondo de la cabina hacia el operador directamente con lo que cualquier contaminante de la placa de cultivo o del área de cultivo iría al operador directamente. Por otro lado, el diseño más aislado de las cabinas de flujo laminar vertical ofrece mejores niveles de seguridad tanto para el cultivo como para el operador, existiendo diferentes tipos de cabinas de flujo vertical, dependiendo de las especificaciones de seguridad de cada aplicación. En este caso, aunque parte del aire que pasa por la cabina se recicla en el interior de la misma, es esterilizado de nuevo por un filtro HEPA tanto si se dirige hacia la cabina de nuevo, como si se elimina al laboratorio, con lo que los posibles contaminantes del cultivo nunca llegan al operador o al ambiente del laboratorio.

El mantenimiento de las cabinas de flujo laminar es esencial para el mantenimiento de las condiciones asépticas idóneas para realizar cultivos celulares. En este caso, lo más importante es la comprobación de que el flujo laminar de aire mantiene, en el interior de la cabina, una velocidad constante y dentro de unos rangos óptimos definidos por el fabricante de las cabinas. La situación normal es que a medida que pasa el tiempo de trabajo de la cabina, los filtros HEPA vayan colmatándose y los poros se vayan cerrando al filtrar las partículas del aire. En este caso, la velocidad del flujo de aire irá disminuyendo con el tiempo, disminuyendo así mismo la presión que ejerce el flujo de aire laminar sobre el aire del laboratorio permitiendo que aire del mismo, potencialmente contaminado, pueda entrar en el área de trabajo de la cabina. Por otro lado, si se produce alguna perforación accidental del filtro HEPA aumentará la velocidad de salida del aire en ese punto, con lo que se producirán turbulencias con el aire del laboratorio que pueden llevar a la entrada del mismo en la cabina y la consecuente pérdida de condiciones asépticas en el área de trabajo. Por ello, las revisiones rutinarias y la certificación del correcto funcionamiento de las cabinas por parte del fabricante de la misma, es esencial para asegurar la esterilidad del área de trabajo de cultivos. Así, se revisará que la velocidad del flujo laminar del aire en el interior de la cabina sea la óptima, pudiéndose detectar cambios en la velocidad del motor de la cabina o la colmatación o perforación del filtro HEPA. En cualquier caso, en condiciones normales de trabajo, los fabricantes recomiendan el cambio de los filtros HEPA tras un tiempo de trabajo determinado.

B) INCUBADOR DE CO_2:

El mantenimiento de los cultivos celulares durante el tiempo que dure el experimento se debe realizar en unas condiciones específicas para que las células puedan vivir y desarrollarse y que son aportadas por un equipo específico de cultivos celulares que es el incubador de CO_2 (Figura 2-2).

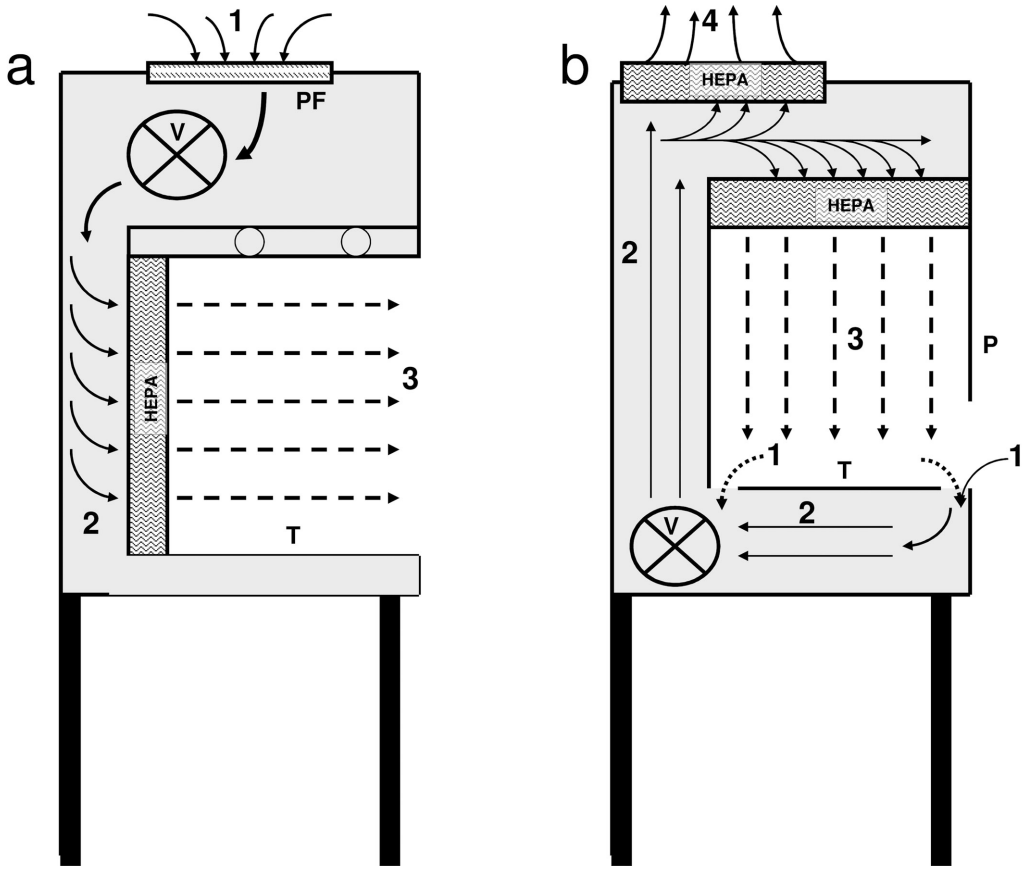


Figura 2-1: **Esquema de cabinas de flujo laminar (visión lateral)**. a) Cabina de flujo laminar horizontal: El aire tomado del laboratorio (1) pasa a través del prefiltro (PF) para eliminar partículas grandes (polvo) y es impulsado (por el ventilador V) al interior de la cabina (2) y al filtro HEPA que lo esteriliza y envía a la zona de trabajo (T) en régimen de flujo laminar (3). b) Cabina de flujo laminar vertical: El aire tomado del laboratorio (1) entra en la cabina a través las rejillas de la zona frontal del área de trabajo (T). De ahí es impulsado por un ventilador (V) hacia la parte superior de la cabina (2) donde: una parte pasa por el filtro HEPA y sale al área de trabajo en régimen de flujo laminar (3) y otra parte es filtrada por otro filtro HEPA, para eliminar cualquier contaminante, y liberado al exterior (4). Parte del aire estéril que llega al área de trabajo recircula a través de una rejilla (1) situada justo encima del ventilador (V) y que se mezcla con el aire captado del laboratorio. Una pantalla transparente (P) aísla el área de trabajo del exterior dejando sólo un espacio libre en la zona inferior para introducir las manos del operario.

El ambiente óptimo en el cual las células en cultivo viven y que es controlado por el incubador de CO_2 se caracteriza por tres factores fundamentales:

— **Temperatura:** La temperatura óptima de incubación de la mayor parte de los tipos celulares procedentes de tejidos de mamíferos es de 36.5ºC. Las células en cultivo, normalmente, se desarrollan en unos rangos de temperatura muy estrechos, por lo que el incubador de CO_2 tiene que ser capaz de mantener la temperatura óptima de incubación dentro de ese rango siendo recomendable una variación máxima de ± 0.5ºC. Hay que indicar que la temperatura de incubación se ha de adaptar dependiendo de la temperatura típica a la cual se encuentra *in vivo* el tejido y/o el individuo donante. Así, por ejemplo, las células procedentes de anfibios han de incubarse a unos 26ºC mientras que los cultivos con células y tejidos procedentes de determinadas especies de peces de agua fría pueden llegar a necesitar de una temperatura de incubación de 18ºC, por lo que en algunos casos extremos pueden requerirse incubadores que

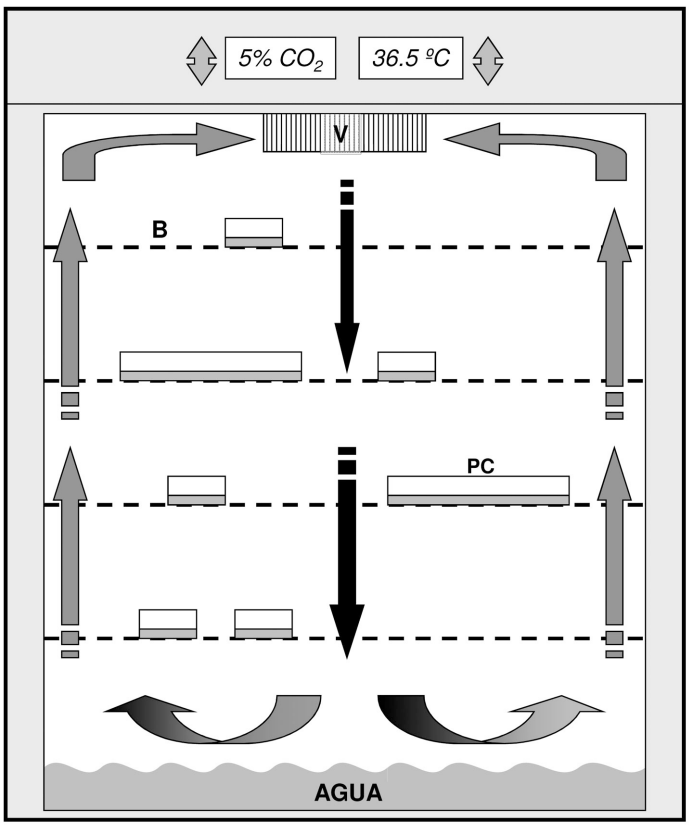


Figura 2-2: Esquema de un incubador de CO_2 (de frente). Para mantener las condiciones óptimas de cultivo (36.5 ºC, 5% CO_2 y saturación de humedad) en todas las zonas del incubador, el aire recircula por el interior desde la parte superior donde es impulsado por un ventilador (V), pasando a través de las bandejas (B), que están perforadas para favorecer el paso del aire, donde se sitúan las placas de cultivo (PC), llegando al depósito inferior de agua, donde se satura en humedad y desde donde sube de nuevo hacia el ventilador cerca de las paredes internas del incubador calentándose a la temperatura adecuada.

puedan enfriar la temperatura ambiente respecto a la del laboratorio. Este requerimiento de mantenimiento de la temperatura estabilizada hace que algunos diseños de incubadores incluyan una cámara en la pared rellena de agua cuya inercia térmica permite que no haya variaciones drásticas de temperatura en el incubador.

— **Mezcla de gases**: Las condiciones habituales de incubación de la mayor parte de los cultivos celulares, referidas a los gases ambientales, son de aire atmosférico mezclado con un 5% de CO_2. Tanto el O_2 como el CO_2 son los dos gases que más influyen en el cultivo y su concentración en la mezcla gaseosa ambiental del incubador debe ajustarse atendiendo a varios factores. Así:

- ***O_2***: Para la mayoría de los cultivos celulares se considera que la proporción de oxígeno del aire (21%) es adecuada para sustentar a las células. En determinados casos, como cultivos de células con niveles metabólicos elevados como las células tumorales o bien cultivos tridimensionales o de órganos en los que la masa de tejido a cultivar hace que en las regiones centrales pueda comprometerse la difusión del O_2, se pueden requerir aportes adicionales de O_2 en el incubador. Para ello algunos modelos incluyen una entrada específica para O_2 con reguladores de presión ambiental en el interior del incubador.

- ***CO_2***: El suplemento de una proporción determinada (habitualmente un 5%) de CO_2 a la mezcla de gases del interior del incubador es esencial para el mantenimiento del pH en el medio de cultivo en niveles cercanos a la neutralidad, balanceando el tampón carbonato-bicarbonato disuelto en el medio de cultivo y, por lo tanto, en los valores óptimos para el cultivo. La mayor parte de los incubadores incluyen detectores de CO_2 en su interior que miden la proporción de CO_2 en la mezcla gaseosa y la corrigen constantemente para mantener esta proporción constante en el tiempo.

— **Humedad:** Las placas de cultivos celulares deben mantenerse en condiciones de humedad ambiental muy elevada, para evitar que se evapore agua del medio de cultivo que sustenta a las células y pueda comprometerse la presión osmótica correcta del medio de cultivo. Por ello, los incubadores llevan un depósito de agua en su interior que se llena de agua purificada y esterilizada para conseguir los niveles de humedad requeridos.

El mantenimiento de estos equipos es muy importante ya que el depósito de agua interior de los incubadores es una potencial fuente de contaminación para los cultivos celulares. Este depósito debe ser revisado y el agua cambiada frecuentemente, junto con un limpiado de las superficies internas del incubador. Así, cada cierto tiempo, se debe parar el incubador, sacar el agua del depósito interno, limpiar todas las superficies internas del incubador, incluyendo las bandejas, con detergentes desinfectantes de superficies de laboratorio y esterilizadas, en lo posible, con un poco de alcohol de 70º antes de ser introducidas en el incubador de nuevo. Por último se añadirá el agua nueva para el depósito, que deberá estar purificada y esterilizada. Además, cada cierto tiempo, que será el indicado por el fabricante del equipo, el incubador deberá ser revisado por el propio fabricante para asegurar el correcto funcionamiento de los componentes y la electrónica del mismo, incluyendo el ventilador y los detectores de temperatura y gases, certificando los estándares de calidad del equipamiento por un tiempo determinado.

Este tipo de incubador de CO_2 permite la incubación de las células sin movimiento, por lo que las células decantarán hacia el fondo de la placa, tenderán a fijarse en el soporte de cultivo y el cultivo se desarrollará anclado al fondo siendo ésta la situación habitual de la mayor parte de las células en cultivo. Pero cuando se desea cultivar células que viven en condiciones de microgravedad, o bien se quieren realizar aplicaciones industriales de los cultivos, éstas se tienen que incubar en incubadores distintos y que se denominan comúnmente "rollers". En principio, son como los incubadores convencionales, pero se les ha añadido un rotor interno que gira a baja velocidad. Esta rotación permite que las botellas de cultivo estén constantemente dando vueltas y esto hace que por un lado, toda la superficie interna de la botella pueda ser colonizada por el cultivo, aumentando la superficie de cultivo, en el caso de células anclaje-dependientes y, por otro lado, que existan unas condiciones ambientales constantes en todo el volumen de medio en la botella para el mantenimiento de altas concentraciones de células en el caso de suspensiones celulares que vivan en microgravedad.

C) MICROSCOPÍA EN CULTIVOS CELULARES

El mantenimiento de las condiciones de cultivo es esencial para que los cultivos celulares se desarrollen de manera correcta. Además de estos factores físico-químicos, también un regular seguimiento visual de las células en cultivo permite asegurar el buen